Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes Mucor Ramannianus

Inaugural-Dissertation

der

philosophischen Fakultät II der Universität Bern

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Fritz Werner Müller

von Sigriswil (Bern)

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Professor Dr. **W. H. Schopfer** angenommen.

Bern, den 21. Dezember 1939.

Der Dekan: Prof. **H. Greinacher.**

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1941

Separatabdruck aus: „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft“
1941, Band 51
(Als Sonderdruck ausgegeben am 2. April 1941)

Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes Mucor Ramannianus

Inaugural-Dissertation

der

philosophischen Fakultät II der Universität Bern

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Fritz Werner Müller

von Sigriswil (Bern)

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Professor Dr. W. H. Schopfer angenommen.

Bern, den 21. Dezember 1939.

Der Dekan: Prof. H. Greinacher.

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1941

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Separatabdruck aus: „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft“
1941, Band 51
(Als Sonderdruck ausgegeben am 2. April 1941)

Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes Mucor Ramannianus.

Von *Fritz Werner Müller.*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern.)

Eingegangen am 11. Mai 1940.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. *Einleitung* 167
II. *Morphologie des Pilzes* 168
III. *Allgemeine Ernährungsbedingungen* 171
A. Die Nährlösung 171
B. Die Kohlenstoffquellen 172
1. Einfluss der Glucosekonzentration auf das Wachstum 172
2. Andere Kohlenstoffquellen 174
3. Die Wirkung von Tannin in der Nährlösung 175
C. Die Stickstoffquellen 176
1. Die optimale Asparaginkonzentration 176
2. Andere Stickstoffquellen 177
D. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration und Veränderung derselben durch Mucor Ramannianus 179
E. Der Einfluss der Sauerstoff- und der Kohlensäurekonzentration . 181
F. Der Einfluss der Temperatur und des Lichtes 182
IV. *Der Einfluss des Aneurins auf das Wachstum des Pilzes* 183
V. *Die Aneurinwirkung von Auszügen aus Pflanzen, Erde und Harn* . . 184
A. Verhalten des Pilzes gegenüber Dialysaten aus Samen und Keimlingen 184
1. Dialysate aus Samen 184
2. Verhalten des Pilzes gegenüber Koniferenkeimlingen 187
B. Die Wirksamkeit der Pflanzenextrakte 189
1. Heisswasserauszüge aus Samen und andern Pflanzenteilen . . 189
2. Trockenrückstandsbestimmungen bei Extrakten und Vergleich der Wirksamkeit 192
C. Bakterien und Pilze als Wirkstoffbildner 194
D. Wirkstoffe im Boden 195
E. Harn als Wirkstoffquelle 197
VI. *Die Eigenschaften der wirksamen Extraktfaktoren. Der M-Faktor* . . 197
A. Prüfung der Extraktaschen auf ihre Wirksamkeit 197
B. Adsorption der wirksamen Faktoren an Tierkohle 198
C. Herstellung eines Aneurinkonzentrates aus Reiskleie 198
D. Die Hitzebeständigkeit der Extraktwirkstoffe und des Aneurins . 200

E. Löslichkeitsversuche 201
1. Versuche über die Löslichkeit des wirksamen Harnfaktors in verschiedenen Lösungsmitteln 202
2. Versuche mit Extrakten aus Reiskleie 205
3. Versuche mit Erdauszügen 206
F. Adsorption der Wachstumsfaktoren an Fullererde 207
G. Fällungsversuche mit Phosphorwolframsäure 208
H. Die Alkalistabilität der wirksamen Extraktstoffe 209
J. Der M-Faktor 211
VII. *Thiazol und Pyrimidin als Wachstumsfaktoren* 212
VIII. *Die Identität zwischen M-Faktor und Thiazol für Mucor Ramannianus* 214
A. Die Chloroformlöslichkeit des Thiazols 215
B. Adsorption an Tierkohle 216
C. Adsorption an Fullererde 216
D. Beständigkeit des Thiazols gegen Alkali 218
E. Ergebnisse 221
IX. *Die Zerlegung des Aneurins in seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol durch Hitze* 222
A. Die Umwandlung von laugeunbeständigen in laugebeständige Extraktfaktoren in der Hitze 222
B. Versuche zur Umsetzung von synthetischem Aneurin in Pyrimidin und Thiazol 225
1. Versuche zur Spaltung des synthetischen Aneurins in der Hitze 226
a) Der Einfluss von pflanzlichen Extraktstoffen 226
b) Einfluss der H-Ionenkonzentration 228
c) Einfluss der Erhitzungsdauer 229
d) Einfluss von Metallen 230
2. Versuche zum Nachweis der durch thermische Spaltung des Aneurins entstandenen Wirkstoffe 231
a) Löslichkeit in Chloroform 232
b) Adsorption an Fullererde 233
C. Folgerungen 234
X. *Die Biosynthese des Aneurins durch Mucor Ramannianus* 235
A. Die Biosynthese des Pyrimidins durch Mucor Ramannianus . . . 235
B. Künstliche Symbiose zwischen Mucor Ramannianus und Rhodotorula rubra 236
C. Die Biosynthese des Aneurins aus Pyrimidin und Thiazol 238
D. Die konstitutionsspezifische Wirksamkeit des Thiazols 241
1. Thiazoloniumverbindungen 241
2. Thiazolderivate und im Thiazol veränderte Aneurinanaloge . . 243
XI. *Die ökologische Bedeutung der Wachstumsfaktoren für Mucor Ramannianus* 244
A. Wachstumsfaktoren und Symbiosen 244
B. Die Bedeutung des Erdbodens für einen Austausch der Wachstumsfaktoren 246
XII. *Zusammenfassung* 249

I. Einleitung.

Die Beobachtung, dass gewisse pflanzliche Organismen auf synthetischer Nährlösung nicht gedeihen, aber ein gutes Wachstum aufweisen, wenn derselben geringe Mengen natürlicher organischer Substanzen beigefügt werden, hat schon früh zu der Annahme geführt, dass diese Organismen noch bestimmte, den Vitaminen ähnliche Wachstumsstoffe benötigen. Eine tiefere Einsicht in die Beziehungen zwischen den Pflanzen und diesen Stoffen wurde jedoch erst durch die Fortschritte der Vitaminchemie in den letzten Jahren ermöglicht. Diese Entwicklung soll hier aber nur soweit verfolgt werden, als sie unser Untersuchungsobjekt, *Mucor Ramannianus* direkt berührt.

In seinen Untersuchungen über die Mykorhizabildung bei den Wurzeln von Waldbäumen hatte Melin (1925) festgestellt, dass der fast ausschliesslich in Wald- und Heideböden vorkommende *Mucor Ramannianus* aus den Koniferenwurzeln wachstumsfördernde Stoffe bezieht. Auf rein synthetischen Nährlösungen gedieh der Pilz, wie schon Hagem (1910) festgestellt hatte, nicht. Waren der Nährlösung aber während einigen Tagen sterile, unverletzte Kiefern- oder Fichtensamen beigefügt gewesen, so entwickelte sich *Mucor Ramannianus* gut. Aus den Samen musste somit ein das Wachstum ermöglichender Stoff in die Nährlösung diffundiert sein. Melin brachte dieses Ergebnis in Beziehung zu Burgeffs (1909) Feststellung, dass Orchideensamen Stoffe abgeben, die die Mykorhizabildner chemotropisch beeinflussen, ferner zu der Beobachtung Hiltners, dass auch die Knöllchenbakterien der Leguminosen durch Wurzelausscheidungen angelockt werden. Da Untersuchungen von Hansteen Cranner (1922 und 1925) ergeben hatten, dass allgemein aus den Samen und Wurzeln Phosphatide diffundieren, folgerte Melin, es könnte sich bei dem auf *Mucor Ramannianus* wirksamen Stoff eben um solche handeln. Diese sollten « ähnlich wie die B-Vitamine aus Hefe auf *Saccharomyzes* und *Penicillium* » wirken. Er vermutete also eine vitaminische Wirkung der Samen- und Wurzeldialysate.

Einige Jahre später kam dann Schopfer von einem anderen Ausgangspunkt her in Berührung mit der von Melin in bezug auf *Mucor Ramannianus* angeschnittenen Frage. Nachdem Schopfer (1931) durch eine in der Maltose Kahlbaum enthaltene Verunreinigung die Zygotenbildung bei *Phycomyces Blakesleeanus* fördern konnte, stellte er fest, dass ein Bierhefeauszug und eine Anreicherung des B_1-Vitamins aus diesem Extrakt, wie auch ein B_1-Konzentrat von Harris eine ebenfalls sehr starke Zygotenbildung bei *Phycomyces* verursachte. Schopfer machte die Vermutung, dass es sich hier um die Wirkung eines Stoffes vitaminischer Natur handle, der sich der

Biosgruppe nähere oder der Gruppe der D-Wuchsstoffe, der heutigen B-Gruppe, angehöre.

Er verglich nun die Wirksamkeit von Weizenkeim- und Reiskleieauszügen mit ihrem Phosphorgehalt und stellte fest, dass ein Auszug aus Reiskleie mit einem geringen Phosphorgehalt eine grössere Zygotenzahl erzeugte, als ein Weizenkeimauszug mit einem bedeutend grössern Gehalt an Phosphor. Ebenso verursachte ein mit Phosphorwolframsäure behandelter Extrakt aus Reiskleie, der nur noch Spuren von Phosphor aufwies, noch Zygotenbildung. Gestützt auf diese Ergebnisse zog Schopfer (1932) die Melinsche Hypothese, dass die Phosphatide der höhern Pflanzen als Wachstumsfaktoren für *Mucor Ramannianus* wirkten, in Zweifel. Mit kristallisiertem Aneurin von Windaus konnte er in der Folge (Schopfer, 1934 b) zeigen, dass dieses, der synthetischen Nährlösung zugefügt, die Wirkung der pflanzlichen Extrakte zu ersetzen vermochte. Es löste nicht nur das Wachstum und die Zygotenbildung bei *Phycomyces Blakesleeanus* aus, sondern wirkte auch stark wachstumsfördernd auf *Mucor Ramannianus* und andere Mucorineen.

Schon vor der Verwendung des kristallisierten Aneurins hatte Schopfer darauf hingewiesen, dass verschiedene Eigenschaften der auf die Mucorineen wirksamen pflanzlichen Extrakte, wie Thermo- und Alkalistabilität, Nichtadsorbierbarkeit an Fullererde und Nichtfällbarkeit durch Phosphorwolframsäure, mit den Eigenschaften des Aneurins nicht übereinstimmten. Durch Vergleich der Wirksamkeit der pflanzlichen Auszüge mit der des reinen Aneurins auf verschiedene Mucorineen konnte er dann nachweisen, dass es sich in den Extrakten ausser dem Aneurin um wenigstens noch einen wirksamen Faktor handeln musste, den er als Faktor M bezeichnete. Dieser war auch auf *Mucor Ramannianus* wirksam (Schopfer, 1935 a).

Aus diesen Feststellungen ergab sich dann die Problemstellung für unsere Untersuchungen an *Mucor Ramannianus*. Sie bestand aus drei Teilfragen :

1. Die Natur des M-Faktors für *Mucor Ramannianus;*
2. die Bedeutung desselben und des Aneurins im Stoffwechsel des Pilzes;
3. die ökologische Bedeutung der wirksamen Faktoren.

II. Morphologie des Pilzes.

Mucor Ramannianus wurde erstmals von Möller im Jahre 1903 bei Untersuchungen der Wurzelmycorhiza junger Kiefern isoliert. Später stellte ihn Hagem (1908) in den sauren Heide- und Waldböden Norwegens als eine der häufigsten Mucorineen fest; seither wurde er als weitverbreitete und häufige Bodenmucorinee von vielen Autoren be-

schrieben. So isolierten ihn u. a. Lendner (1908) in der Schweiz, Johann (1932), Zycha (1935), Linnemann (1935) in Deutschland, Ling Young (1930) in Frankreich, Pispek (1929) in Südslawien, Raillo (1929) in Nordrussland, Povah (1917) und Paine (1927) in Nordamerika, Dale (1914) in Australien.

Der in den Untersuchungen verwendete Stamm von *Mucor Ramannianus* stammt von Baarn. Auf günstigem Nährsubstrat entwickelt

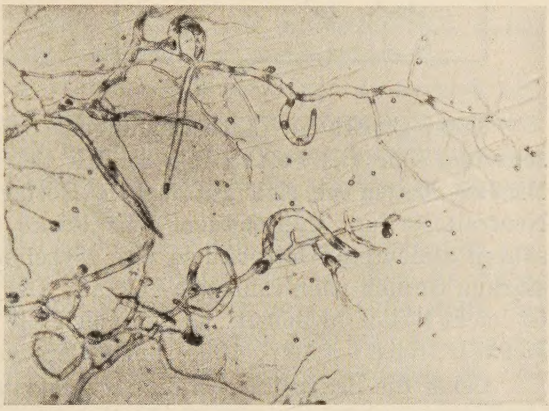


Abbildung 1. Junge Hyphen von *Mucor Ramannianus* mit einigen Anfängen von Gemmenbildung.

Mucor Ramannianus eine blassrote Decke, die oft einige Zeit nach der Sporangienbildung in ein Gelb oder Grau übergeht. Die rote Farbe rührt von den braunroten Sporangien her, die auf sehr kurzen, höchstens 1 mm langen Trägern sitzen. Die Sporangien besitzen eine durchschnittliche Grösse von 30—50 μ Durchmesser, die Kolumella ist klein, im Mittel 8 μ (Linnemann). Die Sporen sind stark oval, 4—6 μ lang und 3—4½ μ breit. Sie schwanken in Form und Grösse sehr stark. Die Sporangienträger weisen 10—20 μ unter der Kolumella eine Querwand auf. Die Hyphen besitzen selten Querwände. Die Wachstumsformen der Hyphen sind äusserst unregelmässig. Hyphen von einem Durchmesser von 2—3 μ verdicken sich langsam oder plötzlich zu solchen von 8—9 μ. Sie sind dann angefüllt von gelbschimmernden Tröpfchen mit einem Durchmesser von 3—3½ μ. Dann finden sich in den Hyphen Riesenzellen eingeschaltet, die durch Querwände abgetrennt sind und meist kugelige Form besitzen. Sie sind ebenfalls mit gelben Tropfen gefüllt. Oft findet man an Hyphen runde, dicker bewandete Gebilde, die man vielleicht als Chlamydosporen betrachten darf.

Ist das Nährsubstrat ungünstig, z. B. zu grosser CO_2-Gehalt (Johann) oder ungünstige Wasserstoffionenkonzentration, so werden besonders viele Gemmen erzeugt. Oft ergibt sich ein Bild, das einer Sprossung gleicht. Makroskopisch drückt sich diese Gemmenbildung als eine Knöllchenbildung des Myzels aus.

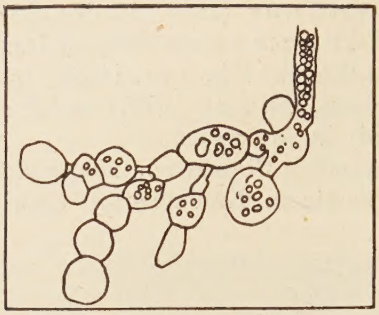


Abbildung 2.
Wachstum in ungünstigem Milieu.
Gemmenbildung.

Unter günstigen Nährbedingungen speichern die Hyphen und Riesenzellen sehr viel Fette (Abb. 3). Mit Fettfärbungsmitteln (Sudan III, Nilblau) lassen sie sich gut färben. Rotfärbung mit Nilblau wies auf Neutralfette hin, währenddem sehr starke dunkle Färbung auch Fettsäuren andeutete. Getrocknete alte Myzelien weisen auch immer einen starken Geruch nach ranzigem Fett auf. Der gelbe Farbstoff der Hyphen ist leicht löslich in Benzin. Es kann sich wie bei *Phycomyces* und *Mucor hiemalis* (Schopfer, 1939) um β-Carotin handeln.

Ueber die Sexualität bei *Mucor Ramannianus* hat Johann (1932) Untersuchungen angestellt. Er konnte aber unter keinen Bedingungen einen seiner 12 Stämme zur Kopulation bringen, weshalb er sich der Auffassung anschloss, dass dieser Pilz seine Sexualität verloren habe.

Mucor Ramannianus weist somit einige Eigenschaften auf, die die Frage berechtigt erscheinen lässt, ob es sich bei ihm überhaupt um eine Mucorinee handelt (Linnemann, 1936).

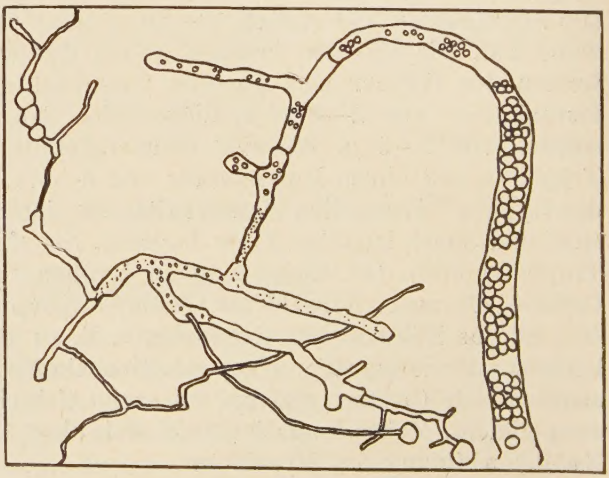


Abbildung 3.
Hyphenbildung bei *Mucor Ramannianus*. In der Hyphe rechts Fettspeicherung.

III. Allgemeine Ernährungsbedingungen.

A. Die Nährlösung.

Ausgegangen wurde von der Coonschen Nährlösung:

5 % Glucose,
1 ‰ Asparagin,
0,5 ‰ Magnesiumphosphat,
1,5 ‰ primäres Kaliumphosphat.

Dazu kam noch kristallisiertes Aneurin. Als optimale Dosis waren 60 γ pro Liter Nährlösung festgestellt worden. Siehe Seite 183.

Alle Versuche wurden in Erlenmeyerkolben aus Jenaerglas von 150 ccm Inhalt ausgeführt. Zu den Pfropfen wurde reinste Spitalwatte verwendet. Als am günstigsten erwiesen sich 20 ccm Nährlösung pro Erlenmeyerkolben. Die Sterilisation der Nährlösung erfolgte im Dampfautoclav bei 120° C während 15 Minuten.

Unter diesen Bedingungen setzte sofort ein starkes Wachstum von *Mucor Ramannianus* ein. Nach etwa 14 Tagen trat auf dem die Nährlösung überdeckenden Myzel eine Rosafärbung auf, die die Reife der ersten Sporangien anzeigte. Doch stellte sich erst nach ungefähr einem Monat eine deutliche Verlangsamung des Wachstums ein (Abb. 4). Die in einem Monat gebildeten Myzeltrockengewichte betrugen durchschnittlich 180 mg. Nach 57 Tagen waren in einem Versuch bei 40 Kulturen durchschnittlich 258 mg Trockensubstanz gebildet worden. — Ohne Aneurinzugabe zur Nährlösung betrug das in einem Monat unter sonst gleichen Bedingungen gebildete Myzeltrockengewicht 0—5 mg.

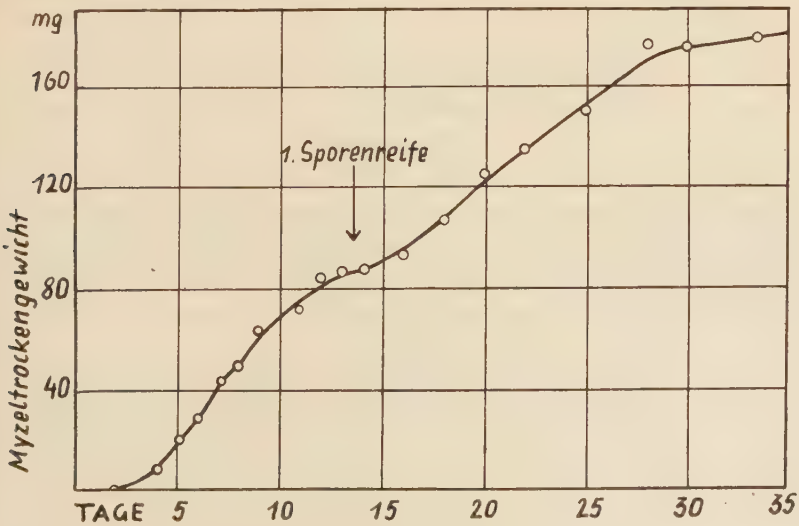


Abbildung 4.
Wachstum von *Mucor Ramannianus* während der Dauer eines Monats.

B. Die Kohlenstoffquellen.

1. Einfluss der Glucosekonzentration auf das Wachstum.

In der bisherigen Nährlösung wurde nun unter Wahrung aller übrigen Bedingungen die Glucosekonzentration verändert. Um eine allzu grosse Veränderung der Konzentration durch den Glucoseverbrauch des Pilzes während der Versuchsdauer zu vermeiden, wurde die Wachstumsdauer auf neun Tage beschränkt. *Mucor Ramannianus* gedieh besonders gut bei Konzentrationen von 1—8 %. Dagegen trat bei höheren Konzentrationen eine zunehmende Hemmung auf, und bei 25 % blieb das Wachstum vollständig aus. Besondere Wachstumserscheinungen traten nicht auf.

In der Natur wird für *Mucor Ramannianus* von Bedeutung sein, welche geringste Zuckerkonzentration er für das Wachstum benötigt. Ein Versuch zeigte ein Ansprechen schon auf eine Glucosequantität von 0,1 g in 1 Liter Nährlösung. Das Trockengewicht des Myzels übertraf hierbei die gesamte Glucosemenge um mehr als das dreifache (Tabelle 1).

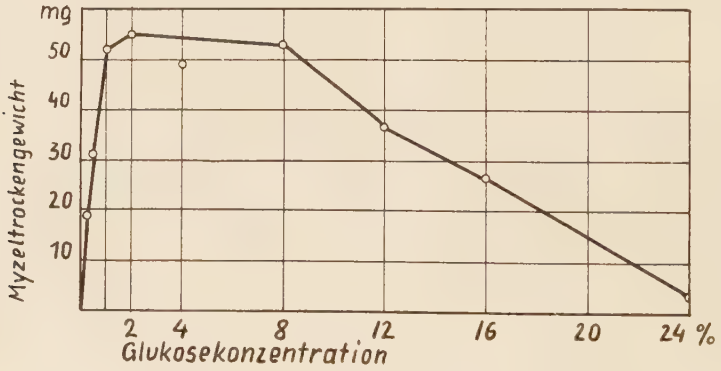


Abbildung 5.
Der Einfluss der Glucosekonzentration auf das Wachstum.

Mucor Ramannianus ist also nicht imstande, seinen Bedarf an organischem Kohlenstoff aus dem Asparagin zu decken; aber spurweise scheint er Asparagin als Ersatz auszunützen, besonders wenn dieses in hoher Konzentration vorhanden ist.

Tabelle 1.
Glucosekonzentration der Nährlösung und Myzelbildung.

Glucose ‰	0	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	1,5	2,0
» mg pro 15 ccm	0	1,5	3,0	4,5	7,5	15	22,5	30,0
Myz.-Gew. b. 1 ‰ Aspa-	0,5	5	5,5	6,5	6,5	—	11,5	14
» » » 8 ‰ ragin	2	7	9	9	10	12	13,5	14

In diesem Zusammenhang sei auch der ökonomische Koeffizient für *Mucor Ramannianus* erwähnt. Unter diesem Ausdruck wird das Verhältnis zwischen verbrauchter Glucose und Trockengewicht des gebildeten Pilzmyzels verstanden. Er gibt unter Vernachlässigung der übrigen, in nur sehr geringer Quantität assimilierten Nahrungsstoffe an, wieviel der aufgenommenen Kohlehydrate der Organismus als Baustoff und wieviel er zur Energiegewinnung verwendet.

Tabelle 2.

Bestimmung des ökonomischen Koeffizienten von *Mucor Ramannianus*

Tage des Wachstums	Verbrauchte Glucose	Myzelgewicht	Oekonomischer Koeffizient
0	0	—	—
1	0	Sp.	—
2	0	1,4 mg	—
4	81,6 mg	10,8 mg	0,134
5	122,4 mg	27,0 mg	0,220
6	153,0 mg	39,4 mg	0,258
7	122,4 mg	61,0 mg	0,498
9	178,6 mg	73,0 mg	0,409
11	224,4 mg	83,5 mg	0,372
14	293,2 mg	100,5 mg	0,343
16	300,9 mg	104,0 mg	0,345

Der Versuch wurde derart durchgeführt, dass die normale Nährlösung (Aneurinzusatz : 1,6 γ Aneurin Hoffmann la Roche pro 20 ccm) mit der Präzisionspipette in die Erlenmeyerkolben verteilt und der Anfangsglucosegehalt pro Erlenmeyerkolben mit der Zuckerbestimmungsmethode nach Bertrand festgestellt wurde. Dann wurde jeder Kolben gleichmässig beimpft und Tag für Tag Bestimmungen des Myzeltrockengewichts und der restlichen Glucosemenge in der Nährlösung vorgenommen. Daraus liess sich der ökonomische Koeffizient berechnen. Er stieg (Tabelle 2) in den ersten sieben Tagen bis auf rund 0,5 und fiel dann in den nächsten Tagen wieder bis auf 0,34. Die beste Ausnutzung der Glucose als Baustoff erfolgte also um den siebenten Tag. Mit einem ökonomischen Koeffizienten von 0,49 bis 0,34 in der Hauptwachstumsperiode macht *Mucor Ramannianus* gegenüber andern Pilzen, z. B. *Absidia coerulea, Aspergillus niger* (Terroine et Wurmser) und *Phycomyces Blakesleeanus,* bei welchem Werte von 0,35 bis 0,41 gefunden wurden (Schopfer), keine Ausnahme.

2. Andere Kohlenstoffquellen.

Das Verhalten des Pilzes gegenüber andern Kohlehydraten und weitern organischen Kohlestoffquellen gibt Tabelle 3 wieder. Die Menge der der Nährlösung zugesetzten verschiedenen Kohlestoffquellen entsprach der molekularen Konzentration einer 5%igen Glucoselösung. Das heisst, Disaccharide wurden statt in einer 5%igen in einer 10%igen Konzentration zugesetzt usw. Allerdings war dieses Prinzip bei hochmolekularen Stoffen (Stärke, Inulin) nicht durchzuführen.

Tabelle 3.
Die Ausnützbarkeit der verschiedenen Kohlenstoffquellen durch *Mucor Ramannianus*.

Kohlehydrat	Wachstum	Kohlehydrat	Wachstum
Monosaccharide		*Polysaccharide*	
Pentosen:		Stärke	+++
Arabinose	+++	Cellulose	—
Xylose	+++	Inulin	+++
Hexosen:		Dextrin	+++
d-Glucose	+++	*Glucoside*	
d-Mannose	+++	Salicin	+
d-Galaktose	+++	Aesculin	++
d-Fructose	++	Amygdalin	—
Disaccharide		Phloridzin	—
Maltose	+++	α-Methylglucosid	—
Lactose	+++	*Alkohole*	
Saccharose	+++	Mannit	+++
Cellobiose	++	Sorbit	+++
Trisaccharid Raffinose	+	Glycerin	+++

(+++ sehr gutes Wachstum, ++ mittelmässiges Wachstum, + schwaches Wachstum, — kein Wachstum.)

Es können somit von *Mucor Ramannianus* alle untersuchten Kohlehydrate abgebaut werden bis an die Cellulose; zur Prüfung des Wachstums auf Cellulose war der kohlehydratfreien Nährlösung ein Stück reinstes Filtrierpapier so zugesetzt worden, dass es gerade noch die Oberfläche der Lösung berührte. Am besten wurde *Mucor Ramannianus* durch die Maltose gefördert. Im Versuch war das Wachstum auf dem Trisaccharid Raffinose schwach. Von den Glucosiden wurden nur Salicin und Aesculin ausgenützt. Ein gutes Wachstum zeigte der Pilz aber auch auf den mehrwertigen Alkoholen, von denen allerdings nur Mannit, Sorbit und Glycerin geprüft wurden. Ohne Zusatz von Aneurin war nur auf der Maltose Kahlbaum ein Wachstum beobachtet worden. (Schopfer, siehe Einleitung.)

Da in den Zellmembranen Pektin und Hemicellulosen eingelagert sind, die dem Pilz in der Natur vielleicht zur Verfügung stehen werden, wurde sein Verhalten auch gegenüber einigen dieser Substanzen untersucht. Diese sind zum Teil wasserunlöslich; deshalb wurden die Erlenmeyerkolben teilweise mit etwas Watte beschickt, mit der kohlehydratfreien Nährlösung versehen und dann die zu prüfenden Stoffe daraufgeschüttet. Auf diese Weise war es dem Pilz möglich, an die unlöslichen Stoffe heranzukommen und enzymatisch zu lösen. Verwendet wurden Pektin Schuchardt « für wissenschaftliche Zwecke », Lichenin Siegfried, Lignin Schuchardt und Xylan Schuchardt.

Tabelle 4.

Das Verhalten des Pilzes gegenüber Pektin und Hemicellulosen.

C-Quelle	Mit Watte	Ohne Watte
Pektin . . .	Wachstum sehr gut	Wachstum sehr gut; 100 und mehr mg
Lichenin . .	» » »	» vorhanden
Lignin . . .	» fast null	etwas Myzel am Boden um das Lignin
Xylan . . .	» » »	Wachstum schwach (bis 20 mg)
Kontrolle . .	—	» bis 4 mg

Mucor Ramannianus gedeiht auf Pektin und Lichenin gut, auf dem Holzstoff und dem Xylan dagegen nur sehr schwach oder nicht. Als Pilz des Waldbodens kann er dort wohl aus den pflanzlichen Membranen das Pektin der Mittellamelle und das Lichenin, das in allgemeiner Verbreitung eine Reservesubstanz der Zellen darstellt (K a r r e r und S t a u b, 1924), auswerten. Auf Pektin gedieh der Pilz auch ohne Aneurin. Es handelt sich auch hier um eine Verunreinigung.

3. Die Wirkung von Tannin in der Nährlösung.

Da angenommen werden kann, dass *Mucor Ramannianus* an seinen natürlichen Fundorten mit den Gerbstoffen der Pflanzen in Berührung kommen muss, wurde ein orientierender Versuch mit Tannin durchgeführt. Einer Serie von Kulturlösungen mit einer steigenden Menge Aneurin wurde durchwegs 0,1 ‰ und einer weitern 1 ‰ Tannin zugesetzt.

Tabelle 5.

Die Wirkung von Tannin auf *Mucor Ramannianus*.

Aneurin pro 20 cc	0	0,1	0,2	0,4	0,6	1,2 γ
Kontrolle: kein Tannin .	0	16	22	77	86	120
0,1 ‰ Tannin	0	0	Sp	8	28	fehlt
1,0 ‰ »	0	0	0	0	0	0

Gerbstoff übt eine ausgesprochen toxische Wirkung aus, hingegen vermag *Mucor Ramannianus* bei einem genügenden Aneuringehalt der Nährlösung eine Vergiftung von $^1/_{10}$ ‰ zu überwinden. Eine Hemmung des Pilzwachstums durch die Gerbstoffe in Pflanzenabsuden konnte ebenfalls festgestellt werden (vgl. S. 190). *Mucor Ramannianus* scheint somit nicht eine so grosse Anpassung an seine Umgebung zu besitzen wie andere Pilze, die bis zu 5 ‰ Tannin vertragen (B l u m e r , 1936).

C. Die Stickstoffquellen.

1. Die optimale Asparaginkonzentration.

Vorerst wurde der Einfluss der Konzentration des Asparagins in der Nährlösung geprüft. Wie Abbildung 6 zeigt, steigt das Wachstum von *Mucor Ramannianus* mit steigender Asparaginmenge bis zu 1 ‰ vorerst steil an; dann verlangsamt sich die Gewichtszunahme, kommt aber erst bei einer Konzentration von 20 ‰ zum Stillstand. (Bei sehr hohen Asparaginkonzentrationen waren nach der Sterilisation in der Nährlösung jedoch mit Nesslers Reagens Spuren von Ammoniak nachweisbar.) Die optimale Ausnützung des Asparagins erfolgt somit bei einer Konzentration von 1 ‰, wie sie in der Nährlösung bisher angewendet worden ist.

Verschiedene Asparagine (Hoffmann-La Roche, British Drug House, Schuchardt) lieferten alle gleiches Wachstum. Ohne Aneurinzusatz gedieh *Mucor Ramannianus* auf keinem derselben.

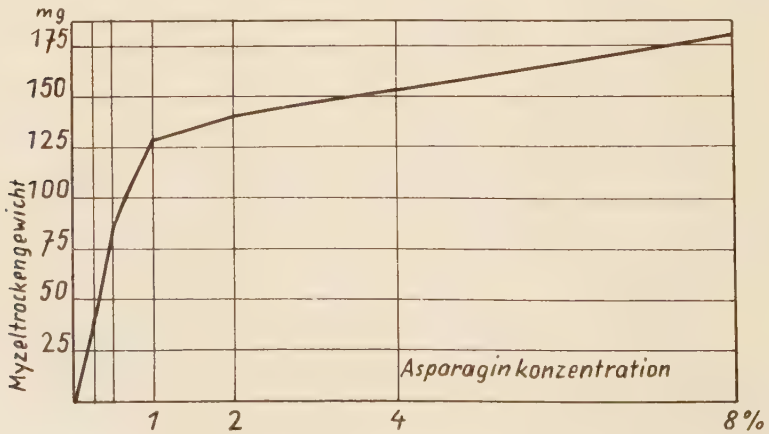


Abbildung 6.

Der Einfluss der Asparaginkonzentration auf das Wachstum. Die Zahlen auf der Abszisse geben die ‰ Asparagin an.

2. Andere Stickstoffquellen.

Das Wachstum auf andern Stickstoffquellen zeigt Tabelle 6. Die zu prüfenden Substanzen wurden ungefähr in der molekularen Konzentration einer 1‰igen Asparaginlösung verwendet. Die erhaltenen Myzeltrockengewichte wurden in vier Gruppen eingeteilt: kein oder spurweises Wachstum (—), schwaches Wachstum bis 30 mg (+), mittelgutes Wachstum bis 60 mg (++) und sehr gutes Wachstum (+++). Aminosäuren erlauben, soweit sie geprüft werden konnten, alle ein Wachstum, ebenso die Polypeptide und Eiweisse. Aber auch anorganische Stickstoffverbindungen können assimiliert werden, z. B. die Nitrate, was im Gegensatz zu den Feststellungen von H a g e m (1910) steht. H a g e m erhielt auf Nitraten deshalb kein Wachstum, weil seiner synthetischen Nährlösung der Wachstumsfaktor fehlte. Dagegen scheinen die Amine schwer oder nicht angreifbar zu sein. Der Grund könnte darin bestehen, dass mit der enzymatischen Spaltung der Amine toxische Substanzen auftreten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Mucor Ramannianus* in der guten Verwertung anorganischer Substanzen gegenüber andern Mucorineen eine Ausnahme bildet, die wie z. B. *Phycomyces* anorganische Stickstoffverbindungen nur schwer oder nicht assimilieren. *Mucor Ramannianus* wird deshalb im Boden kaum je Mangel an Stickstoff leiden. Er wird hier wohl sogar als Konkurrent der höhern Pflanze betrachtet werden können.

Tabelle 6.

Wachstum von *Mucor Ramannianus* auf verschiedenen Stickstoffquellen.

Aminosäuren		*Amine*		*Ammoniumverbindungen*	
Glykokoll	+++	Trimethylamin	0	Ammoniumchlorid	++
Alanin	+	Dioxyphenylamin	0	» sulfat	(+)
Valin	++	Aethylamin	0	» karbonat	+++
Serin	+++	Hydroxylamin	0	» nitrat	++
Asparagin	+++	Glucosamin	(0)	Milchsaures Ammonium	+++
Glutaminsäure	++			Oxalsaures Ammonium	++
Tyrosin	+			Ammoniak	++
Tryptophan	(+)	*Amid*			
Cystin	(+)	Harnstoff	+++		
Lysin	+				
Arginin	+++			*Nitrate*	
Histidin	++			Kaliumnitrat	+++
Nucleinsäure	(+)				
Leucin	(+)				
Polypeptide, Peptone Eiweisse					
Pepton	+++				
Fibrin	+++				
Hühnereiweiss	+++				

Tabelle 7.

Einfluss der H-Ionenkonzentration des Nährbodens auf das Wachstum des Pilzes.

Anfangs-pH	End-pH[1]	Myzel-trocken-gewicht	Wachstumsformen[2]	
			auf flüssigem Nährboden	auf festem Nährboden
2,2		—	kein Wachstum	etwa ½ mm grosse Knöllchen
2,4		—	kein Wachstum	
2,6		—	staubähnl. Knöllchen	Knöllchen mehr zu einer Fläche vereinigt; weiss
2,8		—	Myzelknöllchen etwas grösser	
3,0		—		
3,2		8,5	etwas zusammenhängendes Myzel	rötlicher Schimmer
3,4	3,0	10	Myzel schleimiger	
3,6		20	normal, aber noch Knöllchenbildung	scheinbar vollständig normales Wachstum
3,8		17		
4,0	3,2	23		
4,2		39		
4,4		59	fast knöllchenfrei	
4,6	3,6	82	Myzel, knöllchenfrei,	
4,8		92,5	vollständig normal	sehr schöne Rosafarbe
5,0		96	über Wasser	
5,2	4,0	114,5		
5,4		114,5		
5,6		106,5		
5,8	4,3	99		
6,0		93,5		Rosafarbe schon überschritten
6,2		96	wieder Neigung zur	normal, Rosamyzel
6,4	4,6	108,5	Knöllchenbildung	» »
6,6		92	Knöllchenbildung	» »
6,8		94,5	deutlich	» »
7,0	4,8	67,5	ähnlich wie bei pH 3,4	
7,2		14		deutlich Kugelbildung,
7,4		30	starke Knöllchenbildg.	Myzel rosa
7,6	5,6	14	völlige Knöllchenbildg.	Knöllchen mehr oder weniger zusammenhängend
7,8		14	Farbe schwach bräunlich	
8,0		9		noch rosafarbig
ungepuffert		120,5		

[1] Messung nach vier Wochen.
[2] Beobachtung nach zwei Wochen.

D. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration und Veränderung derselben durch Mucor Ramannianus.

Pistor (1929) stellte für *Mucor Ramannianus* ein pH-Optimum von 3,0 fest; allerdings erhielt er auch bei pH 6,0 noch ein verhältnismässig gutes Wachstum. Es fand eine sehr starke Ansäuerung der Nährlösung statt, die allerdings nicht gepuffert, sondern nur mit Natriumkarbonat bzw. Citronensäure auf den gewünschten pH-Grad eingestellt worden war.

Für die folgenden Versuche wurde die Nährlösung nun gepuffert. Verwendung fand der Puffer von Mc Ilvaine, bestehend aus Citronensäure und sekundärem Natriumphosphat. Die Versuche wurden auf folgende Weise angesetzt : Je 10 ccm doppelt konzentrierte Nährlösung wurden in Erlenmeyerkolben sterilisiert, ebenso auch Pufferlösungen in doppelter Konzentration von pH 2,2 bis pH 8. Nach der Sterilisation wurden die Lösungen über der Flamme zusammengeschüttet und geimpft. Neben den flüssigen Nährböden wurden in gleicher Weise auch Agarnährböden hergestellt. *Mucor Ramannianus* wies ein Wachstum zwischen pH 3,2 und 8,0 auf. Eine optimale Entwicklung bestand bei pH 5,2—5,6. Jedoch hatten auch diese gepufferten Nährböden während der Entwicklung des Pilzes eine starke Ansäuerung erfahren, so dass aus dem Versuch die wirklichen pH-Bedingungen nicht hervorgehen (Tabelle 7).

Die Tabelle 8 gibt Aufschluss über Geschwindigkeit und Mass der Ansäuerung des Milieus durch *Mucor Ramannianus*. Nrn. 1 und 2 geben Versuche wieder, die in gewöhnlichen Erlenmeyerkolben mit ungepufferter Nährlösung gemacht wurden. Nr. 3 zeigt einen ähnlichen Versuch, aber in einem Erlenmeyerkolben von 2 Liter Inhalt angesetzt, aus dem jeweils Flüssigkeitsproben zur pH-Bestimmung entnommen wurden. Nr. 4 zeigt die Resultate mit gepufferten Nährlösungen von verschiedenem Ausgangs-pH. Die Pufferung wurde wie bei den vorhergehenden Versuchen mit Citronensäure und Natriumphosphat nach Mc Ilvaine hergestellt. Die pH-Bestimmung erfolgte elektrometrisch.

Tabelle 8.

Veränderung der H-Ionenkonzentration der Nährlösung durch *Mucor Ramannianus*.

Tage	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4: gepuffert			
				A	B	C	D
0	4,45	4,54	4,50	3,10	3,60	5,40	6,50
6	3,66	3,63	4,00	2,96	3,46	5,02	6,62
14	3,68	3,77	3,76	3,08	3,50	4,53	6,04
24	3,58[1]	3,84	—	2,95	3,40	4,41	4,93
31	3,84	3,91	—	2,86	3,29	4,24	4,60
44	4,22[2]	3,98	—	2,87	3,32	4,43	4,99

[1] 21 Tage. [2] 49 Tage.

Die Ansäuerung des Milieus durch den Pilz war in den ersten Tagen in ungepufferten Lösungen besonders stark und hatte nach einer Woche in den kleinen Erlenmeyerkolben die Grenze erreicht. Im grossen Kolben dauerte die Ansäuerung länger, weil im Verhältnis zum gebildeten Myzel eine bedeutend grössere Flüssigkeitsmenge vorhanden war. In den gepufferten Lösungen dauerte die Ansäuerung etwa vier Wochen. Versuch 4 D zeigt überdies, wie hier in den ersten 14 Tagen zuerst die Ueberwindung des zu alkalischen Milieus stattfinden musste und dann erst die eigentliche Entwicklungsperiode des Pilzes, hier angezeigt in der nun rasch vor sich gehenden Versäuerung der Lösung in den nächsten 10 Tagen, einsetzen konnte. Nach einem Wachstum von etwa einem Monat scheinen dann allgemein sekundäre Prozesse einzutreten, die eher wieder eine Abnahme des Säuregrades zur Folge haben.

Zur Entscheidung der Frage, ob *Mucor Ramannianus* soviel Säure bildet, dass die bisherige Pufferung nicht genügt, oder ob er das pH durch Assimilation des Natriumphosphates verändert, wurde nun für einen weitern Versuch ein Puffer nach Sörensen, bestehend aus sekundärem Natriumcitrat und HCl bzw. NaOH verwendet. Hier trat nun eine ausgesprochene Ansäuerung nur in den schwach sauren Nährlösungen auf. Einerseits muss daraus auf eine gewisse Ausnützung des Natriumphosphates durch den Pilz im Puffer von Mc Ilvaine geschlossen werden; anderseits aber muss in diesem Versuch die Ansäuerung durch wirkliche Säurebildung entstanden sein.

Tabelle 9.

Einfluss der H-Ionenkonzentration der Nährlösung auf das Wachstum des Pilzes.

pH berechnet	I. Citrat ccm	II. ccm	pH gemessen vor Versuch	pH nach dem Versuch	Myzelgewichte				
					1	2	3	4	Mittel
		n/10 HCl							
2,2	3,33	6,67	unter 3,0	unter 3	0	0	0	0	0
3,36	4,5	5,5	3,3	3,4	115	80	73	66	85,5
4,16	6	4	4,1	4,0	101	98	110	79	97
4,89	9,5	0,5	4,7	4,4	59	69	—	—	64
		n/10 NaOH							
5,02	9,5	0,5	4,9	4,7	66	60	—	—	63
5,57	7	3	5,5	4,7	49	57	55	—	54
6,68	5,25	4,75	6,2	4,8	36	28	—	—	32

Citrat: 0,1 m sekundäres Natriumcitrat.

Das beste Wachstum zeigte sich bei pH 4,1 bis pH 3,3. Da der Säuregrad während der Versuchsdauer kaum geändert hat, ergibt sich damit nun auch das wirkliche pH-Optimum für *Mucor Ramannianus*.

E. Der Einfluss der Sauerstoff- und der Kohlensäurekonzentration.

Ein erster Versuch galt der Frage, ob *Mucor Ramannianus* anaerob zu leben imstande ist. Hierzu wurde steriler Malzagar (2 % Malz + 2 % Agar) in Petrischalen mit einer Sporensuspension von *Mucor Ramannianus* geimpft. Ein Teil der Petrischalen blieb als Kontrolle unter normalen Bedingungen, der andere Teil der Schalen kam in ein luftdicht verschliessbares Glasgefäss, das erlaubte, durch eine hineingebrachte Lösung von Pyrrogallol und Natriumhydroxyd den Sauerstoff und die Kohlensäure zu absorbieren. Das Resultat nach acht Tagen Wachstumsdauer war folgendes :

a) Kontrollen : Agar überwachsen, schöne Myzeldecke.
b) Versuch : keine Spur von Wachstum.

Mucor Ramannianus ist somit zur anaeroben Verarbeitung der Nährstoffe nicht imstande, was mit Versuchen von J o h a n n (1932) übereinstimmt.

In bezug auf die die Entwicklung von *Mucor Ramannianus* hemmende Konzentration der Kohlensäure hatte J o h a n n festgestellt, dass ein CO_2-Gehalt von 12 % noch gutes, von 18 % geringes, von 33 % sehr geringes und von 54 % kein Wachstum des Pilzes gestatte. Sporangien entstanden noch bei einem CO_2-Gehalt von 18 %. Unsere Resultate wurden derart erhalten, dass kleine, luftdicht verschliessbare Glasröhren mit Reagensröhrchen, die mit sterilem Malzagar beschickt und geimpft waren, versehen wurden. Die Glasröhren wurden dann mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert und nachher durch Einfliessenlassen von abgemessenen Mengen CO_2 und von Luft bis zu Normaldruck mit steigenden Kohlensäurekonzentrationen versehen.

Tabelle 10.
Der Einfluss der Kohlensäure auf die Entwicklung von *Mucor Ramannianus*.

CO_2-Menge	%	0	10	30	50	70	90
	ccm	0	5	15	25	35	45
Normalluft	ccm	52	47	37	27	17	7
Wachstum auf festen Nährböden . .		gut sichtbares Myzel			Sporen-auskeimung		null
Wachstum auf flüssigen Nährböden .		gutes Oberflächenmyzel			Spur	kein Wachstum	

Die Resultate stimmen mit denjenigen von J o h a n n weitgehend überein (Tabelle 10). Eine ausgesprochene Wachstumshemmung wurde bei CO_2-Konzentrationen über 50 % beobachtet. Aber schon bei 30 %

waren die eigenartigen Knöllchenmyzelien (siehe Seite 170), die nur in ungünstigem Milieu auftreten, vorhanden. Unterhalb 30% CO_2 dagegen schien keine Wachstumshemmung zu bestehen. *Mucor Ramannianus* wird also auch bei stark erhöhtem CO_2-Gehalt der Bodenluft kaum gehemmt werden.

F. Der Einfluss der Temperatur und des Lichtes.

Hagem (1910) stellte für eine Anzahl von ihm untersuchter Mucorineen die untere und obere Temperaturgrenze fest. *Mucor Ramannianus* gedieh bei einer Temperatur von 5—8,5° C schlecht, zeigte dagegen bei 33° C noch gutes Wachstum und erreichte die obere Temperaturgrenze bei 35° C. An diese Ergebnisse anschliessend wurden einige Versuche bei mittleren Temperaturen gemacht. Dabei zeigte sich nach einer Wachstumsdauer von 14 Tagen ein bestes Wachstum unterhalb 20° C.

Temperatur	Mittel Myzelgewicht
28°	50,3 mg
19°	76,5 »
14°	77,2 »

Allerdings war es nicht möglich gewesen, diese Temperaturen im gleichen Raum herzustellen. Doch scheint sich zu zeigen, dass der Pilz kein extrem hohes Optimum hat, wie aus den Ergebnissen Hagems leicht vermutet werden könnte.

Das Licht schien keinen grossen Einfluss auf das Wachstum zu haben. Die Mittelwerte zwischen den Kulturgewichten der im Dunkel und im Licht gezüchteten Myzelien deckte sich weitgehend :

Myzeltrockengewichte	Dunkelkulturen	71,5 mg
»	Lichtkulturen	68 »

Zusammenfassung.

Mucor Ramannianus wächst auf synthetischer Nährlösung nur dann, wenn sie Aneurin enthält. An die Nährstoffe stellt er keine spezielle Anforderungen; er gedeiht auf allen Kohlehydraten ausser auf Cellulose, auf höhern Alkoholen und den pflanzlichen Membranstoffen Lichenin und Pektin. Von den organischen Stickstoffquellen vermag er von den Eiweissen bis herab zu den Aminosäuren alle Stufen auszunützen, gedeiht aber auch mit anorganischen Stickstoffquellen, Ammoniak, Ammoniumverbindungen und Nitraten. Die Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung muss für ein gutes Wachstum zwischen pH 3 und 6 liegen; der Pilz säuert seine Umgebung selbst stark an. Er gedeiht nur aerob. Das Temperaturoptimum liegt bei 14—19° C. Das Licht beeinflusst die Gewichtsbildung nicht.

IV. Der Einfluss des Aneurins auf das Wachstum des Pilzes.

Die Notwendigkeit des Aneurins für das Wachstum von *Mucor Ramannianus* ist schon beschrieben worden. Zu untersuchen bleibt sein Verhalten gegenüber verschiedenen Aneurinkonzentrationen. Abbildung 7 zeigt die Trockengewichtsbildung des Pilzes bei steigender Aneurinkonzentration in 13, 19 und 26 Tagen. Es zeigt sich hier auffällig, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von der Aneurinkonzentration abhängig ist. Bei 1 γ Aneurin pro 20 ccm Nährlösung wurde ein Myzelgewicht von 100 mg in 19 Tagen erreicht, währenddem bei 0,25 γ dafür 26 Tage notwendig waren. Der Stoffwechsel des Pilzes muss somit von der Aneurinkonzentration der Lösung beeinflusst werden.

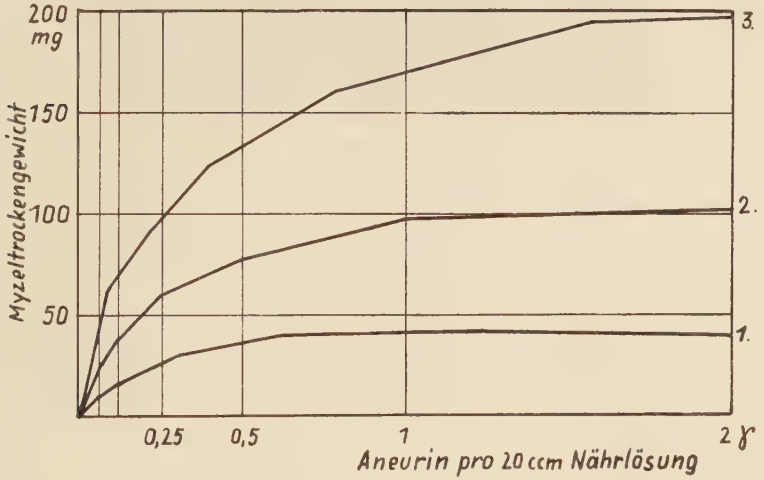


Abbildung 7.

Wachstum von *Mucor Ramannianus* als Funktion der Aneurinkonzentration. 1 = in 13 Tagen, 2 = in 19 Tagen, 3 = in 26 Tagen.

Die optimale Aneurindosis pro 20 ccm Nährlösung betrug nach 13 Tagen 0,6 γ, nach 19 Tagen 1 γ, nach 26 Tagen 1,6 γ. Das Optimum verschiebt sich somit wesentlich nach oben.

Eine überdosierte Aneurinmenge wirkt nicht hemmend auf *Mucor Ramannianus* (Tabelle 11). Die 32fache Dosis der optimalen Aneurinmenge zeigt im angeführten Versuch nur einen unwesentlichen Wachstumsrückstand des Pilzes.

Tabelle 11.

Der Einfluss überdosierter Aneurinkonzentrationen auf *Mucor Ramannianus*. Wachstum 13 Tage.

Aneurin γ/20 ccm	0	0,01	0,02	0,08	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Trockengewicht .	0	3	3	8	15	23	38	69	74	70	69	68	52

Ein Versuch über den Einfluss des gegenseitigen Verhältnisses der Aneurin- und der Asparaginkonzentration auf das Wachstum von *Mucor Ramannianus* ergab, dass das Wachstum von dem in relativ geringerer Menge vorhandenen Faktor begrenzt wird. Daraus darf nicht auf eine direkte Beziehung zwischen Aneurin- und Stickstoffwechsel geschlossen werden. Hingegen zeigt sich in dieser Abhängigkeit doch eine gewisse quantitative Beziehung zwischen Aneurin und Stoffwechsel (Schopfer, 1937 a).

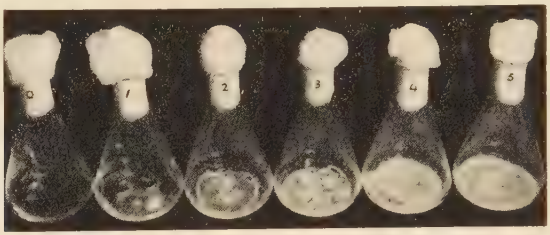


Abbildung 8.
Wachstum von *Mucor Ramannianus* als Funktion der Aneurinkonzentration. Wachstumsdauer 26 Tage. 0 = Kontrolle, 1 = 0,1 γ/20 ccm, 2 = 0,2 γ/20 ccm, 3 = 0,4 γ/20 ccm, 4 = 0,8 γ/20 ccm, 5 = 1,6 γ/20 ccm.

Tabelle 12.
Wachstum des Pilzes als Funktion der Asparagin- und der Aneurinkonzentration.

Asparagin in ‰	Aneurin γ/20 ccm Nährlösung									
	0	0,02	0,08	0,2	0,4	0,8	1,6	4	8	16
0	0	0	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
0,1	0	11	22	24	21	26	19	22	20	25
0,25	0	9	28	44	40	49	40	41	48	42
0,5	0	10	25	59	95	95	106	73	100	72
1	0	8	30	35	84	75	112	147	133	150
2	0	10	26	52	81	96	126	154	137	122
4	0	8	21	48	64	90	146	159	170	153
8	0	11	32	42	64	108	167	194	194	190

V. Die Aneurinwirkung von Auszügen aus Pflanzen, Erde und Harn.

A. Verhalten des Pilzes gegenüber Dialysaten aus Samen und Keimlingen.

1. Dialysate aus Samen.

Melin hatte festgestellt, dass Kiefern- und Fichtensamen der Nährlösung[1] beigefügt in diese Stoffe abgeben, die das Wachstum von

[1] Unter dem Ausdruck Nährlösung wird immer wirkstofffreie synthetische Nährlösung von gewohnter Zusammensetzung (siehe Seite 171) verstanden.

Mucor Ramannianus auslösen (Seite 167). Vorerst wurden diese Versuche mit Samen von *Pinus Strobus* und *Triticum vulgare* wiederholt. Mit Samen von *Picea excelsa, Pinus cembra* und *Pisum sativum* wurden weitere orientierende Versuche durchgeführt.

Die Behandlung der Samen erfolgte in folgender Weise :

Die Samen wurden vorerst zwei Stunden in 30%igem Wasserstoffperoxyd sterilisiert.

Zu diesem Zweck kamen sie in einen Erlenmeyerkolben, der einen mit Gummischlauch und Klemmhahn verschlossenen Untenausfluss besass. Der den Kolben verschliessende Gummistopfen war von zwei Glasröhrchen durchbrochen, von denen das kürzere durch ein Gummistück mit Quetschhahn verschliessbar war und als Ueberlauf diente, das längere dagegen einen sterilen Filter aus Watte trug. Zur Sterilisation wurde der mit dem Samen beschickte Kolben mit Wasserstoffperoxyd gefüllt und verschlossen. Während der Dauer der Sterilisation musste das Ueberlaufrohr offen bleiben, weil durch die Samen eine lebhafte Zersetzung des Wasserstoffperoxyds ausgelöst wurde. Nach zwei Stunden wurde das Ueberlaufröhrchen verschlossen und das Wasserstoffperoxyd abgelassen. Dabei wurde die eintretende Luft durch den Filter gereinigt. Das mehrmalige Auswaschen erfolgte in der Art, dass der Kolben mit sterilem Wasser gefüllt und nach einiger Zeit wieder entleert wurde. Im letzten Wasser blieben die Samen 12 Stunden.

Dann wurden sie in steigender Zahl in die mit je 20 ccm steriler Nährlösung bzw. 10 ccm sterilem Wasser versehenen Erlenmeyerkolben gebracht.

Die eine Hälfte der so vorbereiteten Erlenmeyerkolben wurde nun für 7 Tage bei einer Temperatur von 20° C, die andere Hälfte dagegen bei 29° C gehalten. Es bestanden somit vier verschiedene Gruppen :

Gruppe	1.	Samen	in	Nährlösung	bei 20°
»	2.	»	»	Wasser	» 20°
»	3.	»	»	Nährlösung	» 29°
»	4.	»	»	Wasser	» 29°

Nach 7 Tagen wurde zur weiteren Behandlung der Lösungen jede Gruppe in drei Reihen aufgeteilt. Den wässerigen Lösungen wurde nun je 10 ccm sterile doppelt konzentrierte Nährlösung zugefügt. Reihe A blieb unverändert, in den Reihen B und C wurden die Samen entfernt und Reihe C überdies im Autoklav 15 Minuten auf 120° erhitzt. Nachher erfolgte die Impfung mit *Mucor Ramannianus*. Die Resultate sind in Tabelle 13/14 wiedergegeben. Dabei entsprechen die Zahlen dem Mittelwert aus je zwei Bestimmungen.

Aehnliche Resultate lieferten Samen von *Picea excelsa, Pinus cembra* und *Pisum sativum*. So ergeben sich folgende Folgerungen :

Die Wirkung der Dialysate auf *Mucor Ramannianus* ist nicht auf Koniferen beschränkt. Dialysate aus Samen von *Triticum und Pisum* erzeugten allerdings ein etwas schwächeres Wachstum als solche aus *Pinus Strobus*. Es ist aber unbestimmt, ob das die Folge des Wirkstoff-

Tabelle 13.

Wirkung der Samendialysate aus *Triticum vulgare* auf *Mucor Ramannianus*.

Behandlung der Lösungen	K[1]	Zahl der Samen									
		0	½	1	2	4	6	8	12	16	32
Stoffe in Nährlösung diffundiert											
Dialyse bei 20° C											
Samen in Nährlösung gelassen . . .		0		3	23	29	64	63	89	102	
» entfernt, Lösung nicht erhitzt .				6	12	33	36	47	62	57	
» » » erhitzt . . .				8	11	35	—	45	54	77	168
Dialyse bei 29° C											
Samen in Nährlösung gelassen . . .		0		4	7	27	58	19	82	125	
» entfernt, Lösung nicht erhitzt .			3	3	10	15	17	46	—	—	79
» » » erhitzt . . .			1	16	12	25	38	41	55	78	
Stoffe in Wasser diffundiert											
Dialyse bei 20° C											
Samen entfernt, Lösung nicht erhitzt .			3	4	4	14	26	—	47	60	
» » » erhitzt . . .	5	0	2	3	4	11	22	39	38	52	
Dialyse bei 29° C											
Samen entfernt, Lösung nicht erhitzt .		0	1	2	3	—	13	21	41	50	
» » » erhitzt . . .	9		1	2	2	6	12	16	36	46	74

[1] Kontrolle: 12 Samen in Wasser statt Nährlösung.

Wachstum des Pilzes: 28 Tage.

gehaltes der Samen, der Diffusionsmöglichkeit, der Art des Wirkstoffes oder endlich die Folge von Beistoffen ist.

Die Wirkung der Dialysate ist dieselbe, ob die Dialyse bei 20° oder bei 29° stattgefunden hat. Da durch Hansteen Cranner gezeigt worden war, dass bei 30° auch schwerer lösliche Phosphatide diffundieren, nahm Melin, nachdem er ebenfalls gleich starkes Wachstum in Dialysaten bei 20° und 29° festgestellt hatte, an, dass nur die leicht dialysierbaren Phosphatide einen wachstumsfördernden Einfluss auf *Mucor Ramannianus* ausüben. Diese Versuchsresultate lassen, solange eine Wirkung der Phosphatide nicht bewiesen ist, aber mit gleichem Recht den Schluss zu, dass es sich eben gar nicht um eine Phosphatidwirkung handelt.

Die Dialyse in Nährlösung und in Wasser verlief ähnlich; allgemein war das Wachstum in den Wasserdialysaten eher geringer, was aber von technischen Ungleichheiten herrühren konnte. Blieben die Samen während des Pilzwachstums in der Nährlösung, so wurden allgemein etwas höhere Wirkungen erzielt. Das war auch wahrscheinlich, da wohl die Dialyse während dieser Zeit weiterschreitet. Hingegen trat

Tabelle 14.

Wirkung der Samendialysate von *Pinus Strobus* auf *Mucor Ramannianus*.

Behandlung der Lösungen	K[1]	Zahl der Samen									
		0	½	1	2	4	6	8	12	16	32
Stoffe in Nährlösung diffundiert											
Dialyse bei 20° C											
Samen in Nährlösung gelassen . . .		0	—	76	98	157	191	180	205	215	—
» entfernt, Lösung nicht erhitzt .		0	30	99	100	110	126	147	169	172	171
» » » erhitzt . . .		—	25	50	82	98	188	165	181	191	198
Dialyse bei 29° C											
Samen in Nährlösung gelassen . . .			—	55	131	140	146	167	195	210	284
» entfernt, Lösung nicht erhitzt .			48	81	126	163	157	151	175	185	214
» » » erhitzt . . .			29	63	94	164	179	165	162	172	195
Stoffe in Wasser diffundiert											
Dialyse bei 20° C											
Samen entfernt, Lösung nicht erhitzt .	0	—	5	26	86	89	91	114	128	147	190
» » » erhitzt . . .	0		7	6	40	70	86	—	105	138	224
Dialyse bei 29° C											
Samen entfernt, Lösung nicht erhitzt .	2	—	—	15	31	121	96	135	166	151	208
» » » erhitzt . . .	0		—	73	107	151	177	175	191	202	230

[1] Kontrolle: Samendialysate in Wasser ohne Nährlösung.

Wachstumsdauer: 28 Tage.

zwischen den Gruppen, die erhitzt, und denen, die nicht erhitzt wurden, kein Unterschied auf, woraus hervorgeht, dass die wirksame Substanz soweit hitzebeständig ist, dass eine Sterilisation durchgeführt werden darf, ohne dass Wirkungsverluste auftreten. Es gab aber auch die Möglichkeit, in weitern Versuchen nicht mehr den umständlichen Weg der Dialyse zu beschreiten.

2. Verhalten des Pilzes gegenüber Koniferenkeimlingen.

In diesem Zusammenhang war auch die Frage von Interesse, wie sich *Mucor Ramannianus* gegenüber keimenden Samen und lebenden Keimlingen verhält. Melin hat in seiner Arbeit die Feststellung gemacht, dass es sich bei *Mucor Ramannianus* nicht um einen intracellulär in die Wurzeln der Kiefer eindringenden Pilz handelt, ebenfalls nicht um einen ektotrophen Mykorhizabildner. Somit konnte angenommen werden, dass ein Wachstum auch hier nur durch Dialyse von Stoffen in die Umgebung ausgelöst wird. Die Versuche wurden nun derart ausgeführt, dass sterile Samen (s. Seite 185), hauptsächlich von *Picea excelsa*, in Erlenmeyerkolben zur Keimung gebracht und mit

Mucor Ramannianus geimpft wurden. Dabei musste eine Nährlösung gewählt werden, die den Koniferen wie dem Pilz ein Wachstum ermöglichte. Es wurden folgende Kombinationen versucht :

A. Knopsche Nährlösung.
B. Knopsche Nährlösung + 5 % Glucose.
C. Knopsche Nährlösung + 5 % Glucose + 1 ‰ Asparagin.
D. Kontrolle wie C + Aneurin.

Um den wachsenden Pflanzen Halt zu geben, wurden die Erlenmeyerkolben zum Teil mit einer Schicht reinster Watte beschickt, zum Teil wurden die Nährlösungen mit 2 % Agar verfestigt. Die Sterilisierung der Samen erfolgte nach der oben beschriebenen Art mit Wasserstoffperoxyd. Dann wurde jeder Erlenmeyerkolben mit durchschnittlich 10 Samen beschickt und mit *Mucor Ramannianus* geimpft. Als Kontrollen wurden ferner angesetzt Erlenmeyerkolben nur mit Samen oder nur mit *Mucor Ramannianus*. Die Beobachtungen erfolgten während mehreren Monaten. Von den Samen keimten rund zwei Drittel aus. Diese entwickelten nach 3 bis 4 Wochen die Kotyledonen. Das Wachstum von *Picea excelsa* war in allen Nährböden gut, Unterschiede im Wachstum waren nicht feststellbar. Die Kontrollen mit *Mucor Ramannianus* allein ergaben folgendes :

Wachstum auf	Ohne Aneurin	Mit Aneurin
Knopscher Nährlösung	kein Wachstum	kein Wachstum
derselben + Glucose	kein Wachstum	gutes Wachstum
derselben + Glucose + Asparagin . .		

Knopsche Nährlösung eignet sich also mit einem Zusatz von Glucose als Grundnährlösung für *Mucor Ramannianus*. Asparagin ist, wie nach den Seite 177 beschriebenen Versuchen vorauszusehen war, überflüssig.

Die Beobachtung an den Versuchskulturen ergab ein Wachstum der Samen auf Agar- wie auf Wattenährböden. *Mucor Ramannianus* entwickelte sich überall soweit, dass er als rötlicher Flaum auf den Samenschalen sichtbar war. Das Wachstum war auf den nicht keimenden Samen allgemein besser als auf den auskeimenden. Dabei war es vorerst gleichgültig, ob die Nährlösung Glucose enthielt oder nicht. War dagegen Glucose vorhanden, so dehnte sich das Wachstum von *Mucor Ramannianus* von den Samenschalen aus auf den Nährboden. Das heisst also, dass *Mucor Ramannianus* imstande ist, seinen Nährstoffbedarf aus den Samen zu decken, dass die notwendigen Nährstoffe aber nicht oder nicht in genügender Menge in die umgebende Lösung diffundieren. Hingegen diffundieren, wie aus den vorhergehenden Versuchen bekannt ist, genügend Wirkstoffe. Wenn *Mucor Ramannianus*

aber in der kohlehydratfreien Nährlösung auf den Samen zu gedeihen vermag, so muss man annehmen, dass er hier imstande ist, wasserunlösliche Kohlenstoffquellen auszunützen. Das stimmt mit dem beobachteten Wachstum auf Pektin und Lichenin, zwei in allen Membranen vorhandenen, wasserunlöslichen Stoffen, überein. (Karrer P. u. Staub; Schellenberg). Aber auch der im Gerbstoff glucosidisch gebundene Zucker kann wahrscheinlich ausgenützt werden, wie schon Melin vermutete. Dass das Wachstum um die toten Samen besser ist, erklärt sich aus der vollständigen Permeabilität der toten Membranen für gelöste Stoffe. Wenn die Samen auskeimten, so griff der Befall durch *Mucor Ramannianus* nicht auf den Spross und die Kotyledonen über. Diese schienen auch bei mikroskopischer Betrachtung frei von Myzel. An den Wurzeln entwickelte sich, soweit sie in den Agar oder in die Nährlösung eindrangen, kein Pilzmyzel. Da aber, wo sie oberflächlich über den Nährboden hinstrichen, entwickelte sich hie und da ein schwaches Myzel. Es schien aber nur dort aufzukommen, wo die Wurzeln Absterbeerscheinungen aufwiesen; diese rührten offensichtlich nicht von einem Befall durch *Mucor Ramannianus* her, da sie auch in den sterilen Samenkulturen auftraten. In Querschnitten durch die befallenen Wurzelstellen konnte auch nie ein Eindringen der Pilzhyphen in das Wurzelinnere festgestellt werden. Es ist somit einfach anzunehmen, dass *Mucor Ramannianus* die absterbenden Wurzelstellen deshalb bevorzugt, weil hier eine freie Permeabilität mehr Stoffe durchtreten lässt. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von Melin, dass *Mucor Ramannianus* keine Mykorhiza bildet, sondern dass die Beziehung zu den höhern Pflanzen eine rein äussere ist. Die Dialyse aus Wurzeln in die Nährlösung war ganz bedeutend geringer als aus Samen.

B. Die Wirksamkeit der Pflanzenextrakte.

1. Heisswasserauszüge aus Samen und andern Pflanzenteilen.

Eine Extraktion von *Triticum*samen, während 15 Minuten bei 115° extrahiert, liess so viele Stoffe in die Lösung übertreten, dass *Mucor Ramannianus* darauf ohne Zusatz von Nährstoffen eine maximale Entwicklung zeigte. Dagegen konnte bei einer vorsichtigen Heisswasserextraktion bei 95° eine Nährstoffwirkung vermieden werden. Allerdings wurde durch diese Behandlung keine quantitative Extraktion der Wirkstoffe erzielt; wenn die Samen während des Wachstums des Pilzes in der Nährlösung blieben, so stieg dessen Myzelgewicht rascher und höher an als sonst. Ein Vergleich zwischen einem Absud und einer entsprechenden Dialyse während 7 Tagen zeigt, dass durch den Absud etwa fünfmal mehr Wirkstoffe in die Lösung übertraten. Eine Dialyse kommt somit nicht einer Auswaschung der Samen gleich (Abbildung 9).

Bei einem analogen Versuch mit Samen von *Pinus strobus* stand die Wirksamkeit der Absude erheblich weniger über der der Dialysate. Das Verhältnis war rund 1 : 2 (Abbildung 10). Um zu prüfen, ob die Diffusion der Wirkstoffe in den Absuden durch die starken Samenschalen gehemmt wird, wurden einige Extraktionsversuche mit gequetschten Samen von *Pinus cembra* angestellt. Ferner wurden Auszüge aus blossen Schalen wie aus blossen Kernen hergestellt, um festzustellen, welche Samenteile Wirkstoffe speichern. Um ferner die Wirkung

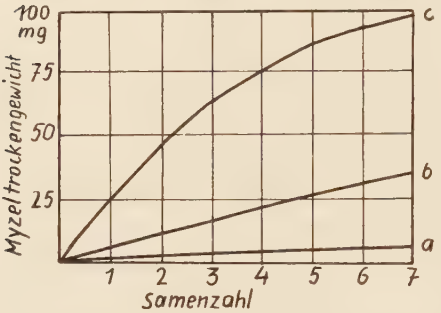


Abbildung 9.
Wachstum von *Mucor Ramannianus* auf Absud von Weizenkörnern.
a) Absud ohne Nährlösung.
b) Vergleich mit der Wirksamkeit eines entsprechenden Dialysates.
c) Absud mit Nährlösung.

des Gerbstoffes der Schalen auf das Wachstum des Pilzes zu beobachten, wurde in einem Teil der Schalenextrakte der Gerbstoff mit kristallisiertem Eiweiss gefällt und entfernt. Das überschüssige Eiweiss wurde dann durch Alkoholzusatz gefällt und ebenfalls entfernt. Endlich konnte die alkoholische Lösung abdestilliert und der Trockenrückstand mit Wasser aufgenommen werden. Die Resultate gibt Tabelle 15 wieder. Der Vergleich von Zeile 1 mit Zeile 2 ergibt, dass die gequetschten Samen ganz bedeutend mehr wirksame Stoffe in das Lösungsmittel abgaben als die ganzen Samen : Verhältnis rund 1 : 4. Die Schale bildet also eine Diffusionshemmung. Ein Vergleich der Zeilen 3 und 4 zeigt, dass auch die Samenschalen Wirkstoffe enthalten, aber die Wachstumsförderung bleibt auf etwa $^1/_8$ derjenigen der Kerne stehen. Die Hauptwirkung bei den Absuden aus ganzen Samen musste deshalb doch von den Kernen herrühren. Ein Vergleich von Zeile 6 mit Zeile 7 führt zum Schluss, dass der Gerbstoff der Schalen in grösseren Dosen hemmend wirkt, während er in ganz kleinen Mengen eher zu stimulieren scheint. Noch deutlicher zeigt sich dies beim Vergleich der Zeilen 2 und 5. Während Absude von gequetschten Samen (Kern und Schale) schon mit einem Samen pro Erlenmeyerkolben ein Wachstum ergeben, das mit zunehmender Samenzahl kaum mehr steigt, zeigen Kerne allein (ohne tanninhaltige Schalen) vorerst ein geringes, mit steigender Kernzahl aber fortwährend zunehmendes, die andere Serie stark überholendes Wachstum. Die Ergebnisse stehen somit in Uebereinstimmung mit den Untersuchungen mit reinem Tannin (s. Seite 176).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Embryonen den relativ grössten Wirkstoffgehalt aufweisen.

Da *Mucor Ramannianus* die Wurzeln der *Picea*pflänzchen in den Erlenmeyerkolben nur spärlich und die Kotyledonen überhaupt nicht befiel, wurde deren Wirkstoffgehalt durch Absude bestimmt. Die erhaltenen Myzelgewichte von *Mucor Ramannianus* zeigten, dass die Wirkstoffmengen der Kotyledonen grösser waren als die der Wurzeln. Ferner erzeugten die Extrakte von *Picea excelsa* ein besseres Wachs-

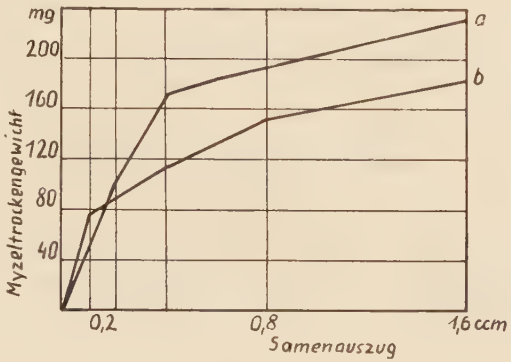


Abbildung 10.
Wachstum (30 Tage) von *Mucor Ramannianus* in Nährlösung mit Absud von *Pinus Strobus* (Kurve *a*). Im Vergleich die Wirksamkeit eines entsprechenden Dialysates (Kurve *b*).

tum als solche von *Abies pectinata*. Allgemein war bei den Keimlingen ein verminderter Wirkstoffgehalt gegenüber den Samen festzustellen.

Da sich gezeigt hatte, dass die auf *Mucor Ramannianus* wirkenden Faktoren auf keine bestimmten pflanzlichen Organe beschränkt sind, wurden nun zur Feststellung des weitern Vorkommens dieser Faktoren bei den höhern Pflanzen Absude von Blättern verwendet. Die Versuche wurden so durchgeführt, dass ungefähr gleich grosse Blattstücke verschiedener Pflanzen der Nährlösung zugesetzt und mitsterilisiert wurden. In der einen Serie wurden sie nach der Sterilisation entfernt, in der andern nicht. Folgende Zusammenstellung zeigt, dass überall ein Wachstum aufgetreten war. Es bedeutet: + schwaches Wachstum, ++ gutes Wachstum, +++ sehr gutes Wachstum.

Castanea sativa (++), *Betula pendula* (++), *Carpinus Betulus* (+), *Corylus Avellana* (++), *Corylus purpurea* (++), *Ulmus scabra* (++), *Buxus sempervirens* (+++), *Ilex aquifolium* (++), *Vitis vinifera* (++), *Aucuba japonica* (++), *Hedera Helix* (+), *Histaria sinensis* (++), *Rosa pendulina* (++), *Prunus Lauroceranus* (+), *Prunus avium* (++), *Pirus malus* (+), *Cydonia maliformis* (++), *Fraxinus excelsior* (++), *Syringa vulgaris* (++), *Viburnum Opulus* (+), *Picea excelsa* (+++), *Pinus silvestris* (+++), *Taraxacum officinale* (++), *Plantago major* (++), *Dryopteris Filix mas* (++).

Tabelle 15.

Der Wirkstoffgehalt verschiedener Teile des Samens von *Pinus cembra.*

Art des Absudes	Menge der Lösungen entspricht			
	1 Samen	2 Samen	4 Samen	8 Samen
1. Samen ganz	55	97	174	184
2. Samen gequetscht	174	161	185	183
3. Schalen allein	17	42	57	85
4. Kerne allein, ganz	71	171	223	246
5. Kerne allein, gequetscht	—	148	210	263
6. Schalenextrakt unbehandelt . . .	24	40	92	107
7. Schalenextrakt gerbstofffrei . . .	15	20	114	138

Eine positive Wirkung wies auch faulendes Buchenlaub auf, das vom einen Herbst zum andern auf dem Waldboden gelegen hatte.

Diese Ergebnisse decken sich mit denjenigen von Schopfer (1936) für *Phycomyces. Mucor Ramannianus* verlangt somit, wie *Phycomyces,* einen Wirkstoff, der in der höheren Pflanze allgemein verbreitet ist.

2. Trockenrückstandsbestimmungen bei Extrakten und Vergleich der Wirksamkeit.

Um Extrakte mit einer geringeren Menge unwirksamer Beistoffe zu erzielen, wurde nun eine Extraktion mit 99prozentigem Alkohol versucht. 800 Weizenkörner (30 g) wurden zu Mehl verarbeitet und zwei Stunden im Soxhletapparat extrahiert. Zur Entfernung der im Alkohol gelösten Fette wurde ferner die Hälfte des Extraktes mit gleichviel Petroläther ausgewaschen. Es waren somit vorhanden :

I. Unentfetteter alkoholischer Extrakt aus 400 Körnern,
II. entfetteter alkoholischer Extrakt aus 400 Körnern,
III. Petrolätherphase.

Alle Lösungen wurden auf 20 ccm eingeengt — 1 ccm entsprach dann 20 Körnern — und in der Weise der Nährlösung zugesetzt, dass zur Entfernung des Alkohols bzw. Petroläthers die entsprechenden Mengen in die leeren Kulturkolben gebracht, hier abdestilliert und die Trockenrückstände mit der Nährlösung aufgenommen wurden. Zum Vergleich wurde noch ein wässeriger Auszug aus Weizenkörnern geprüft.

Der Versuch (Tabelle 16) zeigte eine Löslichkeit der Wirkstoffe in Alkohol, nicht aber in Petroläther; folglich hatten gleiche Mengen der Extrakte I und II auch ungefähr dieselbe Wirkung. Diese blieb aber hinter der der wässerigen Auszüge zurück. Eine Extraktion in Wasser verlief also vollständiger.

Tabelle 16.

Alkoholischer Auszug aus Weizenkörnern. Trockenrückstände und Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus*.

Körner	1	2	4	8	16	32	64
Trockenrückstand aus Extrakt II in mg	0,7	1,4	2,8	5,6	11,2	22,4	44,8
Extrakt I	11	11	18	33	79	124	—
» II	—	10	19	32	54	100	116
» III	kein Wachstum						
Wässeriger Auszug	32	40	64	98	—	—	—

I = Alkoholauszug unentfettet, II = Alkoholauszug entfettet, III = Petrolätherphase.

Der Trockenrückstand des entfetteten alkoholischen Extraktes betrug 138,6 mg pro 10 ccm; der Trockenrückstand pro Korn somit 0,693 mg. Die Wirksamkeit war also rund $^1/_{20\,000}$ derjenigen des Aneurins.

Auf die gleiche Weise wurde auch Reiskleie verarbeitet (Tabelle 17). Hier hatte schon ein gegenüber Weizenkornextrakt 11mal geringerer Trockenrückstand eine volle Wirkung auf *Mucor Ramannianus*. Auffällig ist ferner der Anstieg der Myzelgewichte bis über 200 mg. Die Reiskleieauszüge müssen somit für *Mucor Ramannianus* besonders günstig wirken. Ein Unterschied zwischen einem Auszug in Wasser und in Alkohol trat hier nicht auf.

Tabelle 17.

Alkoholischer Auszug aus Reiskleie. Trockenrückstände und Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus*.

Extraktmenge ccm	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	1,6
Entspricht frischer Reiskleie g	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4
Trockenrückstand aus Lösung II mg	0.9	1,8	3,6	5,4	7,2	10,8	14,4
Myzelgewicht I	59	118	152	191	180	219	229
» II	78	97	122	157	147	135	157
Petroläther	kein Wachstum						
Vgl. wässeriger Auszug . . .	83	145	160	176	192	196	212

Von weitern ähnlichen Bestimmungen bringt Abbildung 11 einige zur Darstellung. Ferner sind zwei Aneurinkurven eingetragen, von denen bei der einen die Aneurindosis 1000-, bei der andern 10 000mal überhöht, d. h. die Aneurinwirkung 1000- bzw. 10 000mal verkleinert dargestellt ist. Als am wirksamsten erwies sich ein Hefeauszug; seine

Wirkung betrug ziemlich genau ein Tausendstel des Aneurins. Eine Wirkung von $^1/_{1000}$ bis $^1/_{10\,000}$ des Aneurins besassen die Trockenrückstände von Reiskleie- und Eichenblattextrakten. Eine noch geringere Wirksamkeit wiesen Arvenkernauszüge und Auszüge aus Arvenschalen, *Picea*wurzeln und *Picea*kotyledonen auf. Die Trockenrückstände der meisten Extrakte führten also in einer Konzentration von weniger als 0.25 ‰ zu einem optimalen Pilzwachstum. Bei Extrakten aus Hefe

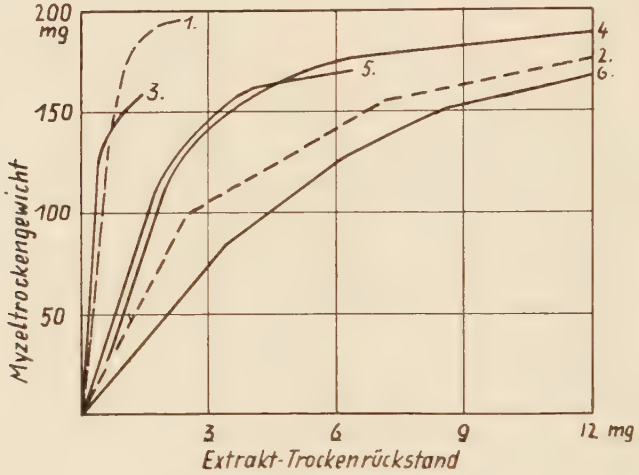


Abbildung 11.

Die Wirksamkeit einiger Extrakte bezogen auf die Trokkenrückstände. 1 = Aneurin (Gewicht 1000 × überhöht), 2 = Aneurin (Gewicht 10,000 × überhöht), 3 = Hefe, 4 = Reiskleie, 5 = Eichenblatt, 6 = Arvenkern.

wirkte schon eine Konzentration von 0.025 ‰ optimal. Diese Werte, die mit nicht speziell gereinigten Extrakten erhalten wurden, machen eine Nährstoffwirkung derselben unwahrscheinlich.

C. Bakterien und Pilze als Wirkstoffbildner.

Versuche, inwieweit *Mucor Ramannianus* auch durch Stoffe zum Wachsen angeregt werden kann, die durch Bodenorganismen erzeugt werden, wurden auf die folgende Art durchgeführt. Sterile, aneurinfreie Nährlösung und 2 %ige Peptonlösung wurden mit je einer Spur Walderde geimpft. Die Peptonlösung verwandelte sich innert 14 Tagen durch die Bakterien in eine trübe Lösung. Diese wurde nun zum Teil ultrafiltriert, auf $^1/_{10}$ eingeengt und als Wirkstoffquelle der Kulturlösung für *Mucor Ramannianus* zugesetzt. — Auf der gleich geimpften Pilznährlösung

entwickelte sich an Stelle der Bakterien eine mächtige Myzeldecke von Waldbodenpilzen und verbreitete den eigentümlich süssen Geruch des Tannenwaldbodens. Nach drei Wochen wurde die Pilznährlösung gleich behandelt wie die Peptonlösung und ebenfalls an *Mucor Ramannianus* auf die gebildeten Wirkstoffe geprüft. Aus den Versuchen (Abbildung 12) ergab sich, dass die Bodenpilze und -bakterien auf *Mucor Ramannianus* wirksame Stoffe erzeugten und diese zum Teil an die

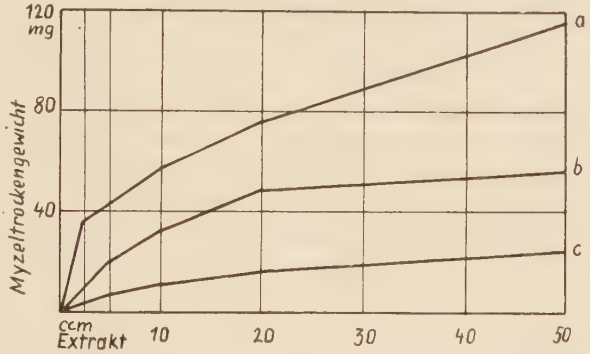


Abbildung 12.
Wirkung von gebrauchten Nährlösungen.
Kurve *a*: Wirksamkeit der Bakteriennährlösung, nicht filtriert.
Kurve *b*: Wirksamkeit derselben Nährlösung, aber ultrafiltriert.
Kurve *c*: Wirksamkeit der blossen Peptonlösung.

Nährlösung abgaben. Wohl ergab die Peptonlösung an sich schon eine Wachstumsförderung, doch entsprach diese bloss etwa $^1/_{16}$ der nicht ultrafiltrierten Bakteriensuspension. Die ultrafiltrierte Bakteriennährlösung wirkte halb so stark wie die nicht filtrierte. Das lässt den Schluss zu, dass die Bakterien selbst ungefähr gleichviel Wirkstoffe enthielten, wie sie an die Lösung abgegeben hatten. Zu ähnlichen Resultaten führten die entsprechenden Versuche mit Bodenpilzen.

D. Wirkstoffe im Boden.

Für Bakterien und Algen, wie für einige Flagellaten ist die wachstumsfördernde Wirkung von Erddekokten bekannt (Pringsheim, 1935). Lwoff und Lederer (1935) haben mit *Polytomella agilis* nachgewiesen, dass dabei nicht Humusstoffe, sondern Wachstumsfaktoren die entscheidende Rolle spielen. So sollte auch das Verhalten von *Mucor Ramannianus* gegenüber Auszügen aus Erde geprüft werden. Die möglichst rein, an einem Standort und in einer einheitlichen Tiefe gewonnene Erde wurde vorerst durch eine Reihe immer feinmaschigere Siebe geseiht, um alle Steinchen und Würzelchen daraus zu entfernen. Zur Bestimmung des Gewichtes wurde sie darauf bei 110° getrocknet und dann mit soviel Wasser vermischt, dass ein dünnflüssiger Brei entstand, der eine Stunde lang auf 100° erhitzt wurde. Nach dem Erkalten der Masse wurde die Flüssigkeit von der Erde abgenutscht.

Das Abnutschen ging so langsam vor sich, dass auf ein gründliches Nachwaschen und somit auf ein vollständiges Erfassen der Wirkstoffe verzichtet wurde. Die Lösung musste dann auf etwa $^1/_{10}$ eingeengt werden. Erwähnt sei ein Versuch mit Erde aus einem Rottannen-Buchen-Mischwald, wo die Wachstumswirkung derselben in verschiedener Tiefe und im Vergleich mit ihrem Stickstoffgehalt bestimmt wurde. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach K j e l d a h l. Der pro Pilzkultur zugesetzte Auszug entsprach 40 g trockener Erde. Die stärkste Wirkung auf *Mucor Ramannianus* hatten Auszüge aus Erde in geringer Tiefe (Tabelle 18). Zudem zeigte sich eine ausgesprochene Parallelität zwischen Wirkstoffgehalt und Stickstoffgehalt der untersuchten Proben. Die Intensität der Wirkung von 40 g Erde in 1—3 cm Tiefe entsprach ungefähr einer Wirkung von 0,05 γ Aneurin. Da jedoch die Extraktion unvollständig war, muss der Wirkstoffgehalt der Erdproben grösser gewesen sein. Proben von Wiesenerden, Ackererden und andern Walderden führten zu gleichen Ergebnissen. Allgemein waren die von der Kultur unberührtesten Böden die wirkstoffreichsten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Boden auf *Mucor Ramannianus* fördernd wirkende Faktoren enthält, die besonders in den obern Schichten enthalten sind.

Tabelle 18.

Wirksamkeit eines Dekoktes aus Walderde auf *Mucor Ramannianus.*

Tiefe der Erde unter Nadelschicht	N-Gehalt	Myzeltrockengewicht in mg		
		I	II	Mittel
1— 3 ccm .	1,24 ‰	32	25	**28,5**
6— 8 ccm .	—	18	—	**18**
12—15 ccm .	0,14 ‰	4	5	**4,5**

Ein Vergleich mit dem Wirkstoffgehalt der gerade der Humusschicht aufliegenden Buchenlaubschicht ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Wirksamkeit eines Heisswasserauszuges aus Buchenlaub war rund 20mal stärker als diejenige eines solchen aus der nächsten Erdschicht.

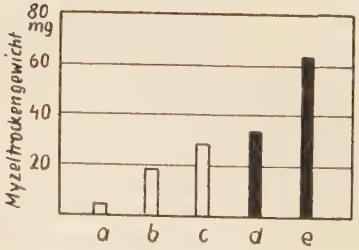


Abbildung 13.

Die Wirksamkeit der Auszüge von Erde und faulendem Buchenlaub.

a—c : Auszüge aus je 40 g Erde.
a : in 11—15 cm Tiefe
b : in 6— 8 cm Tiefe
c : in 1— 3 cm Tiefe.
d, e : Auszug aus faulendem Buchenlaub.
d : aus 2 g trockenem Laub
e : aus 4 g trockenem Laub.

E. Harn als Wirkstoffquelle.

Für *Phycomyces* ist auch im Harn ein wirksamer Faktor vorhanden (Schopfer, 1935 b). Zur Prüfung der Wirkung desselben auf *Mucor Ramannianus* wurde menschlicher Harn bei schwachem Vakuum eingeengt und der Pilznährlösung zugesetzt. Bei geringen Quantitäten war eine deutliche Wachstumsförderung des Pilzes zu beobachten, währenddem grössere Mengen (32 ccm Frischharn entsprechend) das Wachstum vollständig hemmten. Neben dem fördernden Faktor mussten somit noch hemmende Faktoren vorhanden sein. (Siehe auch Seite 202.)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *Mucor Ramannianus* auf alle untersuchten Auszüge positiv reagiert hat. Der wirksame Faktor muss sehr verbreitet sein. Er dialysiert leicht aus den pflanzlichen Organen in Wasser. Heisswasser- und alkoholische Auszüge führten ungefähr zu denselben Maximalgewichten des Pilzes wie Aneurin. Besonders wirksam erwiesen sich Extrakte aus Materialien, die als aneurinreich bekannt sind.

VI. Die Eigenschaften der wirksamen Extraktfaktoren. Der M-Faktor.

Wie schon Seite 168 erwähnt worden ist, hat Schopfer festgestellt, dass in den pflanzlichen Extrakten ausser dem Aneurin auf gewisse Mucorineen noch ein anderer Faktor wirksam ist, den er als M-Faktor bezeichnete und der sich vom Aneurin durch eine grosse Alkalistabilität unterscheidet. Dieser Faktor wirkt auch auf *Mucor Ramannianus* positiv. In den Extrakten müssen also wenigstens zwei wirksame Faktoren vorhanden sein. Vorerst wurde nun versucht, den auf *Mucor Ramannianus* wirkenden Aneurinanteil in den Extrakten nachzuweisen und zu bestimmen. Die Eigenschaften des Aneurins, welche für die Untersuchungen in Frage kamen, sind folgende: Gut löslich in Wasser, Methylalkohol, Aethylalkohol, Aceton, unlöslich in Chloroform und Aether, adsorbierbar an Tierkohle, Fullererde, fällbar mit Phosphorwolframsäure, leicht zerstörbar durch Alkalien, relativ hitzebeständig. Diese Eigenschaften wurden nun an den Extraktwirkstoffen untersucht.

A. Prüfung der Extraktaschen auf ihre Wirksamkeit.

Zur Feststellung, dass es sich in den Extrakten um die Wirkung organischer Stoffe handelt, wurden die Aschen der wirksamen Extrakte auf ihren Einfluss auf *Mucor Ramannianus* geprüft. Die Aschen wurden einesteils mit Wasser aufgenommen und der Nährlösung zugesetzt. Andernteils wurden sie mit Salzsäure gelöst, der Nährlösung zugesetzt und diese mit Natronlauge neutralisiert. Eine Förderung des Wachstums von *Mucor Ramannianus* fand nicht statt; ein Wachstum erfolgte

nur, wenn noch Aneurin beigefügt wurde. Es musste sich in den Extrakten somit um echte *Wachstumsfaktoren* handeln.[1]

B. Adsorption der wirksamen Faktoren an Tierkohle.

Aneurin ist an Tierkohle adsorbierbar und kann mit Alkohol in saurem Milieu wieder eluiert werden. Adsorptionsversuche wurden nun mit allen bisher benützten Extrakten durchgeführt. Das schwach saure pH der Extrakte wurde nicht verändert. Die Adsorption an Tierkohle Merck erfolgte entweder derart, dass die Kohle einige Stunden mit den kalten Lösungen in Mischung blieb, oder aber so, dass die Mischung kurz aufgekocht und sogleich filtriert wurde. In beiden Fällen war das Filtrat stets vollständig wirkungslos. Die Wachstumsfaktoren wurden also an die Tierkohle adsorbiert.

Die Elution der Wachstumsfaktoren erfolgte mit einer Mischung von 96%igem Aethylalkohol und n/10-Salzsäure im Verhältnis 1 : 1 bei 80° C während 30 Minuten. Dann wurde die Lösung abgenutscht, mit Natronlauge neutralisiert, dann zur Entfernung des Alkohols abdestilliert und der Trockenrückstand mit Wasser aufgenommen. Die wachstumsfördernden Faktoren konnten durch diese einmalige Elution zu etwa ¾ zurückgewonnen werden. Gleichzeitig ergab sich damit eine weitgehende Reinigung der Wachstumsfaktoren von Begleitstoffen, indem die Trockenrückstände auf einen Viertel herabgemindert wurden. Es zeigte sich ausserdem, dass auch wachstumshemmende Einflüsse in den Extrakten ausgeschaltet werden konnten, die sich sonst bei grössern Extraktzugaben zur Nährlösung in einer verminderten Wachstumsfähigkeit des Pilzes ausdrückten (Tabelle 19).

C. Herstellung eines Aneurinkonzentrates aus Reiskleie.

Nach den Angaben von Naranayan und Drummond, Wassink, Schopfer (1934 c) wurde 1 kg Reiskleie mit 80%igem Alkohol 24 Stunden kalt stehengelassen, dann abgeschüttet und dasselbe einmal in derselben Art und ein zweites Mal mit 50%-Alkohol wiederholt. Die zusammengeschütteten Auszüge betrugen 7 Liter und wurden im Destillierkolben auf einen Liter eingeengt. In die milchig trübe Lösung wurde Barytlauge eingetropft, bis eine Ausflockung eintrat.

[1] Nach Schopfer (1937) fassen wir die wachstumsfördernden Stoffe unter dem Ausdruck Wirkstoffe zusammen und unterscheiden:

a) Wuchsstoffe: Sie sind hormonaler Natur und beeinflussen in letzter Instanz auf spezifische Weise die Formbildung. Hier kommen sie nicht in Betracht.

b) Wachstumsfaktoren: Sie sind vitaminischer Natur und greifen in den allgemeinen Stoffwechsel ein (Assimilierbarkeit der Nährstoffe. Plasmawuchs).

c) Pseudowachstumsfaktoren: Sie sind mineralischer Natur.

Tabelle 19.

Versuche mit einem Reiskleieauszug. Blutkohlenadsorption und Elution der Wachstumsfaktoren.

	1	2	3	4	5
Kontrolle: Trockenrückstände . mg	7,3	14,6	29,3	58,6	88,0
Mucor Ramannianus, Myzelgew. mg	154	149	178	134	130
Eluat aus Blutkohle: Trockenrückstände mg	1,8	3,6	7,2	14,5	—
Eluat aus Blutkohle: Myzelgewichte . . mg	137	166	185	186	—

Wachstumsdauer: 4 Wochen.

Nach einer ersten Filtration wurde damit fortgefahren bis zur Erreichung einer erneuten maximalen Trübung. Dann wurde die Lösung ultrafiltriert und nachher mit Schwefelsäure bis zur vollständigen Fällung des überschüssigen Bariumsulfates beschickt. Nach erneuter Ultrafiltration erfolgte zur Fällung des B_2-Vitamins eine Behandlung mit Bleiacetat. Die Fällung wurde durch Filtration aus der Lösung entfernt und diese nochmals mit Bleiacetat auf eine erneute Fällung geprüft. Zur Entfernung des überschüssigen Bleiacetates wurde nun Schwefelwasserstoff im Ueberschuss in die Lösung eingeleitet. Nach der Filtration wurde die Lösung, die noch das Aneurin und Biosfaktoren, nicht aber das B_2-Vitamin enthalten sollte, auf pH 6 eingestellt und nachher im Destillierkolben, später in offener Schale bis zu einem dickflüssigen Sirup eingeengt. Ein Kilo Reiskleie ergab 50 ccm Extrakt.

Tabelle 20.

Wirkung des Aneurinkonzentrates auf *Mucor Ramannianus*.

Extraktmenge ccm	0,002	0,005	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16
entspricht Reiskleie in g . .	0,04	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Myzelgewicht mit Extrakt . .	—	150	214	185	185	189	188
» » Orypan . .	48	115	156	167	208	205	221
Vergleich mit blossem Reiskleieauszug	145	160	192	212	214	214	—

0,005 ccm des Extraktes, welches 0,1 g frischer Reiskleie entsprach, verursachte schon ein Pilzgewicht von 150 mg. Ein paralleler Versuch mit dem ursprünglichen alkoholischen Auszug aus gleichviel Reiskleie ergab ein Myzelgewicht von 160 mg. Somit war noch annähernd die gesamte Menge der wirksamen Substanz im Extrakt enthalten, d. h. die

wachstumsfördernde Wirkung konnte nicht vom B_2-Vitamin herrühren. Uebrigens waren die jeweiligen Filtrate bei der Herstellung des Extraktes ohne Einfluss auf *Mucor Ramannianus*. Eine höhere Konzentration des Extraktes in der Nährlösung hemmte das Wachstum etwas. Wahrscheinlich rührte dies von hemmenden Stoffen des Extraktes her.

Parallel zu diesen Versuchen wurde auch das käufliche aneurinreiche Reiskleiekonzentrat, « Orypan Liquidum » (Gesellschaft für chemische Industrie, Basel) untersucht. Seine Wirkung war bei niedern Konzentrationen geringer als die des eigenen Extrakts, zeigte aber bei höhern keinen Abfall der Wirksamkeit.

D. Die Hitzebeständigkeit der Extraktwirkstoffe und des Aneurins.

Ein mehrstündiges Erhitzen des Aneurins auf 130° zerstört seine Wirksamkeit auf das Tier vollständig. Dagegen bleibt die Wirkung auf *Phycomyces* erhalten (Schopfer, 1934 b). In unsern Versuchen hatte eine achtstündige Erhitzung einer Aneurinlösung von 20 γ pro 1 ccm auf 130° immer die vollständige Zerstörung, der Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus* zur Folge (Müller, 1937). Diese beobachtete Thermolabilität steht aber im Gegensatz zu spätern Feststellungen, wo die Wirkung des Aneurins auf *Mucor Ramannianus* durch Hitze nicht mehr aufgehoben werden konnte. Da die Frage in anderem Zusammenhang eingehend untersucht wird (Seite 222), sei sie hier nicht erörtert.

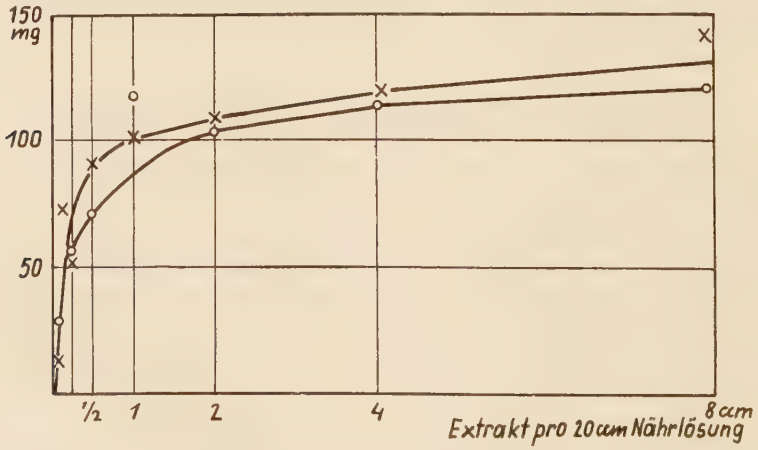


Abbildung 14.

Die Hitzebeständigkeit der Wachstumsfaktoren des Weizenkeimextraktes.

o Kontrolle nicht erhitzt.
x Extrakt 6 Std. auf 125° erhitzt.

Ein wässeriger Auszug aus Weizenkeimen wurde zur einen Hälfte als Kontrolle unbehandelt zurückbehalten, zur andern Hälfte in einem gewöhnlichen Jenaerglaskolben mit Watte verschlossen im Autoclav 6 Stunden auf 125° erhitzt.

Tabelle 21.

Wirkung der 8 Stunden auf 130° erhitzten Extrakte auf *Mucor Ramannianus*.

Substanz	Versuchsmenge ccm						
	0	1	2	4	8	16	32/10
Reiskleie							
Versuch Mittel	—	158	166	170	152	139	
Kontrolle Mittel	—	163	179	192	220	221	
Orypan							
Versuch Mittel	8	87	170	189	205	199	207
Kontrolle Mittel	—	102	147	194	211	250	243
Harnextrakt							
Versuch Mittel	—	14	44	107	145	178	171
Kontrolle Mittel	—	9	24	66	128	—	155
Aneurinlösung in γ	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Versuch	—	6	6	6,5	9	—	—
Kontrolle	11	68	97	128	211	193	178

Die Wirksamkeit des Extraktes auf *Mucor Ramannianus* wurde durch diese Behandlung nicht verändert (Abbildung 14).

Zu ähnlichen Resultaten führten Versuche mit Reiskleieextrakt, Orypan und Harnextrakt, die 8 Stunden auf 130°, und weitern pflanzlichen Auszügen, die 6 Stunden auf 137° erhitzt worden waren (Tabellen 21 und 22). Immer war eine vollständige Hitzeresistenz der Extraktwirkstoffe festzustellen.

E. Löslichkeitsversuche.

Weitere Anhaltspunkte für die Identifikation der wirksamen Extraktstoffe konnte von der Löslichkeit derselben in verschiedenen Lösungsmitteln erwartet werden. Aneurin ist gut löslich in Wasser und Methanol, schwächer löslich in Aethanol und Aceton, unlöslich in Aether, Benzol und Chloroform. Anderseits ist aber bekannt, dass in den pflanzlichen Extrakten und im Trockenrückstand des Harns auch chloroformlösliche Wachstumsfaktoren vorkommen (Schopfer, 1935 b).

Tabelle 22.

Wirkung der 6 Stunden auf 137° erhitzten Extrakte auf *Mucor Ramannianus*.

Extrakt aus		Versuchsmenge ccm			
		1	2	4	8
Weizenkorn	Versuch	8	127	194	192
	Kontrolle	12	100	163	—
Reiskleie	Versuch	26	155	182	212
	Kontrolle	30	148	190	—
Hefeextrakt	Versuch	11	132	159	165
	Kontrolle	35	167	132	—
Eichenblatt	Versuch	9	50	159	170
	Kontrolle	9	69	157	—
Piceakotyl.	Versuch	7	14	24	30
	Kontrolle	fehlt			
Piceawurzeln	Versuch	3	13	22	—
	Kontrolle	1	12	20	—
Arvenschalen	Versuch	6	—	139	205
	Kontrolle	10	—	121	—
Arvenkerne	Versuch	7	103	165	—
	Kontrolle	15	61	184	—

1. Versuche über die Löslichkeit des wirksamen Harnfaktors in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die wachstumsfördernde Wirkung des Harns auf *Mucor Ramannianus* ist schon erwähnt worden. Nun handelte es sich darum, die Lösungseigenschaften der wirksamen Harnkomponenten festzustellen. Der Trockenrückstand von je 100 ccm bei einer Temperatur von etwa 90° eingedampftem Harn wurde mit je 10 ccm verschiedener Lösungsmittel übergossen und 24 Stunden stehengelassen. Dann wurden die Lösungen filtriert und zu Kulturen verwendet. Sie wurden in steigender Menge in die leeren Kulturkolben gebracht, abdestilliert und die Nährlösung zugesetzt. Die Tabelle 23 zeigt in auffallender Weise, dass der Wirkstoff vor allem in Chloroform gut löslich war. Eine ebenfalls noch gute Wirksamkeit zeigten die Lösungen in Aether und Benzol.

Hingegen hinderten die Wasser- und die Methanollösungen, in grössern Konzentrationen der Nährlösung zugesetzt, das Wachstum von *Mucor Ramannianus*; somit war hier mit einem hemmenden Faktor zu rechnen, der in diesen Lösungsmitteln besonders leicht, in Chloroform dagegen nicht löslich ist. Der Versuch wurde deshalb in der Weise vervollständigt, dass eine Chloroformlösung des Harnwirkstoffes ab-

Tabelle 23.

Löslichkeit des Harnwirkstoffes in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Myzelgewicht bei einer Harnmenge von					
	1 ccm	2½ ccm	5 ccm	10 ccm	20 ccm	40 ccm
Aceton	5	9	9	17	18	29
Chloroform	9	10	31	73	—	119,5
Alkohol abs.	7	7	9	12	11	12
Methanol	8	10	15	27	20	0
Wasser	7	9	14	21	29,5	0
Aether sulf.	9	11	8	18	68	95
Petroläther	Sp	4	7	10	17	26
Benzol	Sp	4	10	24	37	92

destilliert und der Rückstand mit den verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24.

Löslichkeit des Harnwirkstoffes in verschiedenen Lösungsmitteln. Test: *Mucor Ramannianus.*

Lösungsmittel	Myzelgewicht bei einer Harnmenge von		
	5 ccm	10 ccm	30 ccm
Aethylalkohol 96 %	12	59	88
Methanol	12	37	92
Wasser	11	23	102
Aceton	20	53	96
Pyridin	68	79	59
Aether	16	36	44
Petroläther	8	20	26
Benzol	27	85	112
Chloroform	38	98	127
Trockenrückstände des Chloroformextraktes mg	0,78	2,34	4,68

Aus diesen Versuchen liess sich nun eindeutig auf die Löslichkeit der wirksamen Stoffe schliessen. Sie sind gut löslich in Chloroform, Wasser, Benzol, Methanol, Aethanol von 96 % und Aceton; dagegen sehr schlecht löslich in Petroläther.

Gegenüber dem reinen Aneurin war die ausgesprochen gute Chloroformlöslichkeit wichtig. Hingegen war noch der Versuch zu machen, ob das Aneurin in diesen kleinen Mengen, die für das Wachstum eines Pilzmyzels nötig sind, nicht ebenfalls chloroformlöslich sei. Einige

Kristalle von Aneurin Windaus wurden in mit Kalziumchlorid getrocknetes Chloroform gebracht und im Kühlschrank einige Tage gut verschlossen stehengelassen. Dann wurde das Chloroform durch einen dichten, getrockneten Papierfilter von den sichtbar erhalten gebliebenen Aneurinkristallen abfiltriert und in der oben beschriebenen Art den Kulturlösungen beigegeben. Schon eine Zugabe von 0,5 ccm pro 20 ccm Nährlösung erzeugte ein maximales Wachstum von *Mucor Ramannianus*. Folglich schien das Aneurin auch in Chloroform genügend löslich zu sein, um ein Wachstum des Pilzes auszulösen. Man könnte zu diesem Versuch einwenden, dass eine absolute Wasserfreiheit des Chloroforms nicht gesichert war; der Versuch hatte aber nicht den Zweck, die wirkliche Chloroformlöslichkeit des Aneurins zu bestimmen, sondern vielmehr zu prüfen, ob die analogen Versuche mit Harnauszügen zu einem Schluss über das Vorhandensein anderer Wachstumsfaktoren als des Aneurins berechtigten. In dieser Art liessen die Versuche noch keinen Schluss zu. Darum wurde die Löslichkeit des Aneurins und des Harnfaktors in Chloroform nun nach der Verteilung in der Chloroform- und Wasserphase einer Chloroformwassermischung untersucht. 25 ccm Harnchloroformextrakt wurden mit gleichviel Wasser im Scheidetrichter durchgeschüttelt, dann entmischt und zur Trockne gebracht. Nach der Bestimmung des Trockengewichtes wurden beide Rückstände mit Wasser aufgenommen und normalen Nährböden zugesetzt.

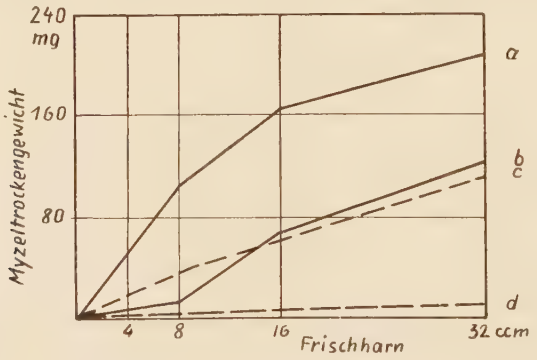


Abbildung 15.

Wirksamkeit der Wasser- und Chloroformphase des Harnwirkstoffes und des Aneurins.
Harnauszug: *a)* Wasserphase, *b)* Chloroformphase.
Aneurin: *c)* Wasserphase, *d)* Chloroformphase.

Das Wachstum von *Mucor Ramannianus* betrug auf den Nährlösungen mit dem chloroformlöslichen Wirkstoffanteil rund ein Drittel bis ein Viertel der Wirksamkeit des wässerigen Extraktes. Ein gleicher Versuch mit kristallisiertem Aneurin zeigte in der Chloroformphase gar

keine Wirksamkeit (Abbildung 15). Das heisst, dass das Aneurin vollständig in die Wasserphase übergetreten war. Daraus musste der Schluss gezogen werden, dass im Harn wenigstens noch ein Stoff ausser dem Aneurin auf *Mucor Ramannianus* wirksam sein muss, der im Gegensatz zum Aneurin sehr gut chloroformlöslich ist.

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass zur Gewinnung des Harnwirkstoffes auch versucht wurde, frischen Harn mit Chloroform auszuschütteln. Ein halber Liter frischer Harn wurde dazu mit gleichviel Chloroform behandelt und der Rückstand daraus den Pilzkulturen zugeführt. Es zeigte sich aber keine Wachstumsförderung. Die Erklärung dieser Tatsache ergab sich später in einem andern Zusammenhang (siehe Seite 234).

2. Versuche mit Extrakten aus Reiskleie.

Dieselben Versuche wie mit Harn wurden nun auch an pflanzlichem Material ausgeführt. 50 g Reiskleie wurden mit Chloroform im Soxhletapparat ausgezogen. Total Chloroformextrakt 160 ccm. Davon wurden 40 ccm mit gleichviel Wasser durchgeschüttelt und die getrennten Phasen zu Kulturen verwendet. Beide Phasen erzeugten eine Wachstumsförderung des Pilzes, und zwar die Chloroformphase die bessere als die Wasserphase. In nicht optimalen Dosen entsprachen die Einzelwirkungen der beiden Phasen zusammen ungefähr der Wirkung der Kontrolle. Es musste sich somit auch hier um die Wirksamkeit noch anderer Faktoren als des Aneurins handeln (Abbildung 16).

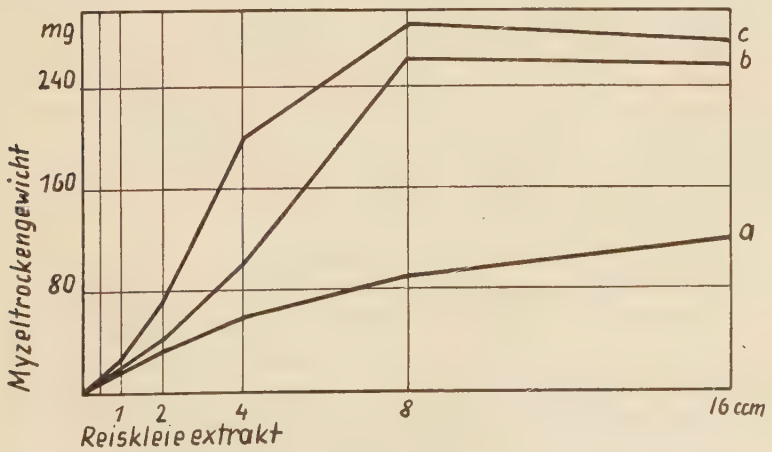


Abbildung 16.

Wirksamkeit von Auszügen aus Reiskleie auf *Mucor Ramannianus*. *a)* Wasserphase, *b)* Chloroformphase, *c)* Totalwirkung des Chloroformauszuges.

Interessant erschien noch ein Vergleich zwischen der Wirksamkeit der Extrakte, die mit verschiedenen Lösungsmitteln aus Reiskleie hergestellt wurden, bezogen auf gleiche Mengen der Ausgangssubstanz. Die Kurven in Abbildung 17 zeigen, dass durch das Chloroform nur ein kleiner Teil des Gesamtwuchsstoffes der Reiskleie herausgezogen werden konnte. Ein wässeriger oder alkoholischer Auszug waren sehr viel wirksamer als ein Chloroformauszug.

Vielleicht dürfte diese Tatsache so gedeutet werden, dass durch die Chloroformextraktion der Reiskleie die chloroformlöslichen Wachstumsfaktoren von den chloroformunlöslichen getrennt werden konnten.

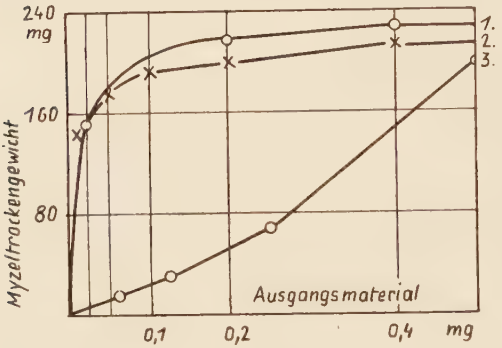


Abbildung 17.
Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Auszüge aus gleichviel Ausgangsmaterial.
Reiskleieauszug:
1. in Alkohol,
2. in Wasser,
3. in Chloroform.

3. Versuche mit Erdauszügen.

Ein Erdabsud wurde an Tierkohle adsorbiert und die wirksamen Komponenten mit n/10-Salzsäure und Alkohol, zu gleichen Teilen gemischt, wieder eluiert. Zu den Untersuchungen diente das Eluat.

5 ccm der Lösung (das entsprach 420 g Erde) wurden bei 100° C eingedampft und mit absolutem Alkohol in der Hitze aufgenommen. Nach dem Filtrieren der Lösung wurde der Rückstand mit Wasser behandelt und wie die alkoholische Lösung zu Kulturen verwendet. Ein analoger Versuch wurde mit Chloroform durchgeführt.

Tabelle 25.
Löslichkeit der Erdwirkstoffe. Wirkung auf *Mucor Ramannianus*.

Lösung in	Myzelgewichte bei Zusatz von	
	0,5 ccm	1,25 ccm
Alkohol abs.	12	27
Rest in Wasser	2	18
Chloroform	0	0
Rest in Wasser	10	32

Es zeigte sich (Tabelle 25) eine Löslichkeit in absolutem Alkohol, nicht aber in Chloroform. Da jedoch die Trockenrückstände vollständig fest waren, so war ihre Durchdringbarkeit besonders durch Chloroform, das nur einen Bruchteil der wässerigen Trockenrückstände löste, nicht genügend gesichert. Ergänzend folgte deshalb ein Versuch über die Verteilung der Bodenwirkstoffe zwischen einer wässerigen und einer Chloroformphase. Auch hier zeigte sich nur eine spurweise Löslichkeit in Chloroform (Tabelle 26).

Tabelle 26.

Löslichkeit der Erdwirkstoffe in Chloroform.

Phase	Myzelgewicht bei Zusatz von		
	½ ccm	1½ ccm	2½ ccm
Wasserphase	8	24	33
Chloroformphase . . .	0	1	3

Es schien sich somit, im Unterschied zu den bisher untersuchten Extrakten, in der benützten Erdprobe um keinen chloroformlöslichen Wachstumsfaktor zu handeln. Weitere Erdproben wurden nicht untersucht.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass im Harn, wie in den pflanzlichen Auszügen, aber vielleicht nicht in der Erde, ein wirksamer Faktor vorhanden ist, der sich durch seine gute Chloroformlöslichkeit scharf von Aneurin unterscheidet. Es wird sich dabei wahrscheinlich um den Faktor M von Schopfer handeln. Wieweit in den wässerigen Phasen auch das Aneurin enthalten ist, lässt sich erst in spätern Versuchen entscheiden.

F. Adsorption der Wachstumsfaktoren an Fullererde.

Bei pH 4,6 ist Aneurin quantitativ an Fullererde adsorbierbar. Ein Versuch zur Adsorption der Wachstumsfaktoren wurde mit einem Extrakt aus Weizenkeimlingen durchgeführt. Weizenkeimlinge waren im Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert worden; dann wurde das Chloroform abdestilliert und der Trockenrückstand mit Wasser neu aufgenommen. Die wässerige Lösung wurde mit der gleichen Menge Puffer von pH 4,6 nach McIlvaine (9,35 ccm Na_2HPO_4 0,2 m + 10,65 ccm Citronensäure 0,1 m) versetzt und mit Fullererde Merck zu einer dünnflüssigen Masse vermischt (25 g Fullererde auf 150 ccm Lösung). Nach einigen Stunden wurde die Lösung filtriert und das Filtrat mit *Mucor Ramannianus* auf seine wachstumsfördernde Wirkung geprüft. Eine gute Wachstumsförderung der Filtrate zeigte dabei eine fehlende, eine schlechte Wachstumsförderung dagegen eine Adsorption an die Fuller-

erde an. — Einer ähnlichen Behandlung wurde auch eine Aneurinlösung unterworfen.

Bei den Extrakten war die Adsorption eine nur geringe (Abbildung 18), dagegen eine vollständige bei reinem Aneurin. Es konnte sich somit in den Extrakten nicht nur um eine Aneurinwirkung handeln. Allerdings muss hier daran gedacht werden, dass der Auszug in Chloroform gemacht wurde, worin das Aneurin kaum löslich ist; deshalb kann daraus nicht auf den Gehalt der Weizenkeimlinge an Aneurin geschlossen werden.

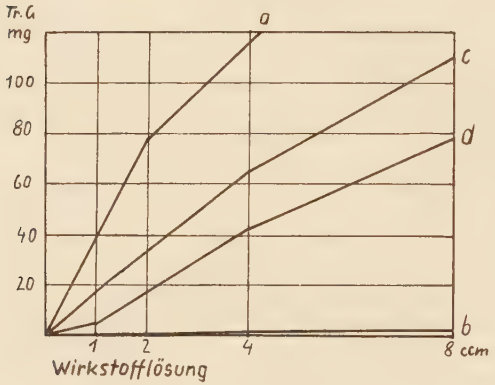


Abbildung 18.
Adsorbierbarkeit der Wachstumsfaktoren durch Fullererde.
a) Aneurinkontrolle. *b)* Filtrat der fullererdebehandelten Aneurinlösung. *c)* Weizenkeimextrakt, Kontrolle. *d)* Filtrat der fullererdebehandelten Lösung.

G. Fällungsversuche mit Phosphorwolframsäure.

Nach Narayanan lassen sich Aneurin und Bios durch Phosphorwolframsäure quantitativ fällen. Die Methodik war folgende : Das Konzentrat wurde in 500 ccm 5%ige Schwefelsäure gebracht und mit einem Ueberschuss von Phosphorwolframsäure gemischt, die in 5%iger Schwefelsäure gelöst war. Nach 12stündigem Stehen wurde filtriert. Dann musste mit Bariumhydroxyd neutralisiert werden, und zwar derart, dass ein Ueberschuss von Bariumhydroxyd zugegeben und nachher mit Schwefelsäure neutralisiert wurde. Die Fällung von Bariumsulfat war zu entfernen.

Der Versuch wurde mit Harn durchgeführt. Der Trockenrückstand von 2,5 Liter Harn wurde mit Chloroform im Soxhletapparat ausgezogen und der Chloroformextrakt mit gleichviel Wasser ausgeschüttet : total 50 ccm Chloroform und 50 ccm Wasser. Je 10 ccm wurden nun einer Phosphorwolframsäurebehandlung unterworfen. Den Arbeitsgang zeigt Tabelle 27.

Die erhaltenen Werte führten zu keinem Ergebnis. Es schien eine teilweise Fällung vorhanden zu sein; doch war es nicht möglich, den gefällten Anteil aus dem Niederschlag wieder zur Wirkung zu bringen. Weitere Versuche mit Harnextrakten und mit Reiskleieauszügen führten zu denselben Resultaten. Zur Kontrolle der Methode wurden nun noch

Tabelle 27.

Fällungsversuche mit Phosphorwolframsäure.

	Harnextrakt					
	Chloroformphase			Wasserphase		
	Kontroll-lösungen	PWS-Fällung		Kontroll-lösungen	PWS-Fällung	
		Filtrat	Niederschlag		Filtrat	Niederschlag
1.	14	11	—	102	29	Sp.
2.	71	30	—	165	79	37
3.	100	45	9	207	152	91
4.	—	119	21	—	165	177

Die Zahlen geben die erhaltenen Myzeltrockengewichte von *Mucor Ramannianus* an. Dabei entspricht Nr. 1 einem Zusatz von 16 ccm Harn zur Nährlösung, Nr. 2 der doppelten, Nr. 3 der vierfachen und Nr. 4 der achtfachen Menge.

zwei Substanzen mit Phosphorwolframsäure behandelt. Einmal ein aneurinangereichertes Produkt von Hoffmann-La Roche (Substanz 3163/6, Vitamin B_1); dieses enthält pro 1 ccm 1000 γ Aneurin. Ferner kristallisiertes Aneurin.

Tabelle 28.

Fällung des Aneurins mit Phosphorwolframsäure. Die Zahlen geben die Myzeltrockengewichte von *Mucor Ramannianus* auf den verschiedenen Lösungen wieder.

Kristallisiertes Aneurin in γ	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Niederschlag	0	0	0	4	8	12,5	24	31
Filtrat				0	0	0	2	4,5
Kontrolle unbehandelt .	11	17	31	63	96	92	—	—

Diese beiden Produkte zeigten eine ausgesprochene Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure. Sie war im aneurinangereicherten Produkt nicht ganz vollständig; hingegen wurde das reine Aneurin total gefällt (Tabelle 28). Die Rückgewinnung des gefällten Wirkstoffes misslang aber auch hier. Der Unterschied zwischen der Fällbarkeit der Extraktwirkstoffe und des Aneurins weist darauf hin, dass in den Extrakten ausser dem Aneurin noch wenigstens ein weiterer Stoff wirksam sein musste.

H. Die Alkalistabilität der wirksamen Extraktstoffe.

Reines Aneurin ist gegen Alkali sehr empfindlich.

Ein Chloroformauszug aus dem Trockenrückstand von 100 ccm Harn wurde in Wasser übergeführt und mit gleichviel NaOH n/10 ge-

mischt. Die Lösung wurde samt einer nicht alkalischen Kontrolle 15 Minuten auf 120° erhitzt, dann mit HCl neutralisiert und auf ihre Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus* geprüft. Analog wurde eine Probe Aneurin behandelt. Abbildung 19 zeigt die völlige Zerstörung des alkalibehandelten Aneurins, währenddem der Harnfaktor in seiner Wirkung kaum merklich herabgesetzt worden ist. Bei Auszügen aus Reiskleie und Weizenkeim trat in analogen Versuchen (siehe auch

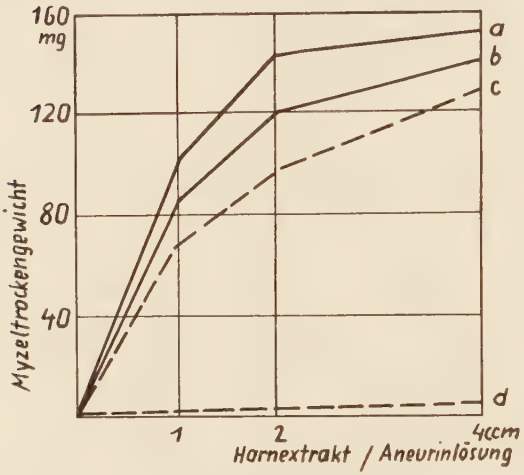


Abbildung 19.
Die Alkalistabilität der auf *Mucor Ramannianus* wirksamen Stoffe im Harn.
a) und *b)*: Extrakt aus Harn; *a)* Kontrolle, *b)* Versuch nach Alkalibehandlung.
c) und *d)*: Aneurin; *c)* Kontrolle, *d)* nach Alkalibehandlung.

Seite 222) eine teilweise, nicht konstante Einbusse der Wirkung ein (Tabelle 29).

Die Versuche wurden nun in der Weise ergänzt, dass geprüft wurde, ob vielleicht die unwirksamen Extraktstoffe einen schützenden Einfluss auf das Aneurin ausübten. Folgende Lösungen wurden eine Stunde auf 120° erhitzt :

a) Aneurinkontrolle nicht alkalisch 20 γ/ccm.
b) Aneurinlösung 20 γ/ccm in n/10 NaOH.
c) Weizenkeimextrakt in n/10 NaOH.
d) Mischung von b + c.

Eine Zusammenstellung der Resultate gibt Abbildung 20.

Wäre das Aneurin unter der Schutzwirkung des Extraktes nicht zerstört worden, so hätte sich bei Lösung *d* die Wirkung von Extrakt und Aneurin summieren müssen; die Kurve *d* müsste also die andern Kurven (*c*) überragen. Das ist nicht der Fall, sondern Kurven *c* und *d* decken sich, was beweist, dass auch in der Lösung *d* das Aneurin vollständig vernichtet worden ist. Somit schützen die Extraktstoffe das Aneurin nicht. Allerdings wissen wir nicht, ob das Aneurin der Extrakte auch in freier Form vorliegt, wie das im Versuch hinzugefügte.

Tabelle 29.

Zerstörung der Wachstumsfaktoren in Reiskleieextrakt durch Alkalibehandlung (NaOH n/10, 120°, 1 Stunde).

Auszug aus Gramm Reiskleie	0	0,25	0,5	1	2	4
Kontrolle unbehandelt .	2	150	220	254	272	—
Versuch alkalibehandelt	3	39	95	160	152	126

Die Versuche lassen darauf schliessen, dass im Harn fast die gesamte, in den Pflanzenextrakten ein geringerer Teil — nach Abbildung 19 für diesen Extrakt etwa ein Viertel — der Wirkung auf *Mucor Ramannianus* einem andern Faktor als dem Aneurin zuzuschreiben ist.

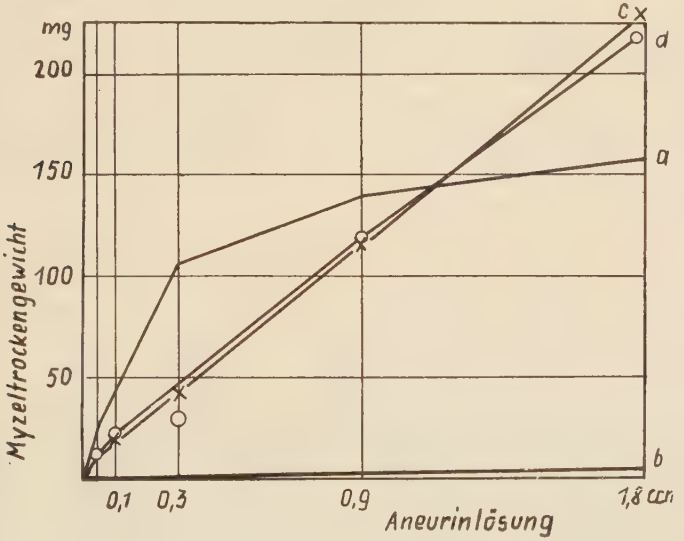


Abbildung 20.

Die Schutzwirkung der unwirksamen Extraktstoffe auf das Aneurin während einer Laugehitzebehandlung.

a) Aneurinkontrolle nicht alkalisch, hitzebehandelt.
b) Aneurinlösung rein laugehitzebehandelt.
c) Weizenkeimextrakt laugehitzebehandelt.
d) Aneurinlösung *b)* und Weizenkeimextrakt *c)* gemischt, laugehitzebehandelt.

J. Der M-Faktor.

Eine Zusammenstellung der Eigenschaften der wirksamen Extraktfaktoren gibt Tabelle 30. Daraus geht hervor, dass ausser dem Aneurin, dessen Nachweis bisher nicht möglich war, dessen Vorhandensein durch

die Versuche aber auch nicht widerlegt ist, ein anderer wirksamer Faktor vorhanden ist, dessen auffälligste Eigenschaften die gute Chloroformlöslichkeit und die Laugebeständigkeit sind. Nach den Versuchen ist dieser Faktor bei pH 4,6 an Fullererde nicht adsorbierbar und nicht fällbar mit Phosphorwolframsäure. Gemeinsame Eigenschaften mit dem Aneurin wären die Löslichkeit in Wasser und Alkohol, die relative (für den M-Faktor grosse) Hitzebeständigkeit und die Adsorbierbarkeit an Tierkohle.

Tabelle 30.

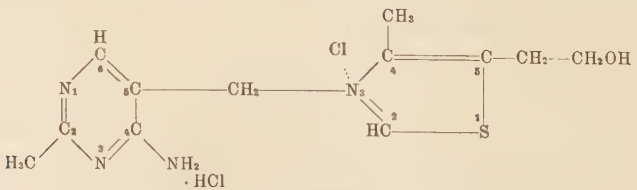
Zusammenstellung der bisherigen Resultate.

Auszug aus	Tierkohle-Adsorption	Adsorption an Fullererde pH 4,6	Hitzebeständigkeit mehrstündig zu 120° C	Laugebeständigkeit	Chloroformlöslichkeit	PWS-Fällung
Aneurin	+	+	(—)	—	—	+
Reiskleie- und Weizenkeim-Extrakt	+	±	+	±	+	±
Harn-Extrakt . .	+	±	+	+	+	±
Erdauszug . . .	+	?	+	?	—	?

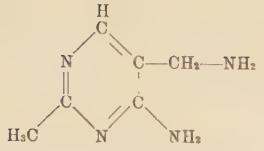
Es wird sich hier wohl um den M-Faktor von Schopfer handeln. Dieser zerfällt nach S c h o p f e r und M o s e r (1936) in einen nicht an Tierkohle adsorbierbaren Faktor MR, der hier also nicht in Betracht kommen kann, und einen Faktor MP, der an Tierkohle adsorbierbar ist. Ob es sich beim Faktor MP für *Mucor Ramannianus* um eine oder mehrere Substanzen und um dieselben wie für andere Mucorineen handelt, bleibt damit noch unentschieden.

VII. Thiazol und Pyrimidin als Wachstumsfaktoren.

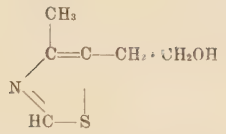
Das Aneurin besteht aus zwei Ringsystemen, dem 2-Methyl-4-amino-5-methylaminopyrimidin und dem 4-Methyl-5-hydroxyäthyl-thiazol, deren Synthese bekannt ist.



I. Aneurin



II.
2-Methyl-4-amino-5-methyl-aminopyrimidin.



III.
4-Methyl-5-hydroxyäthyl-thiazol.

Knight machte zuerst an *Staphylococcus aureus* die Feststellung (Knight 1937), dass das Aneurin durch seine beiden Komponenten ersetzt werden kann. Diese Tatsache wurde durch Schopfer und Jung (1937), Sinclair, Robbins und Kavanagh (1937) für *Phycomyces* und von Lwoff und Dusi (1937 a, b) für Flagellaten bestätigt.

Auf Anregung von Prof. Schopfer (März 1937) wurden nun die beiden Aneurinkomponenten nicht nur zusammen, sondern auch einzeln in ihrer Wirkung auf *Mucor Ramannianus* untersucht.

An Stelle des Aneurins wurden der synthetischen Nährlösung äquimolekulare Mengen Pyrimidin und Thiazol einzeln und gemischt beigefügt.

Nach dem Molekulargewicht für	Aneurin	337
	Pyrimidin	138
	Thiazol	143

entspricht 1 γ Aneurin 0,41 γ Pyrimidin und 0,42 γ Thiazol.

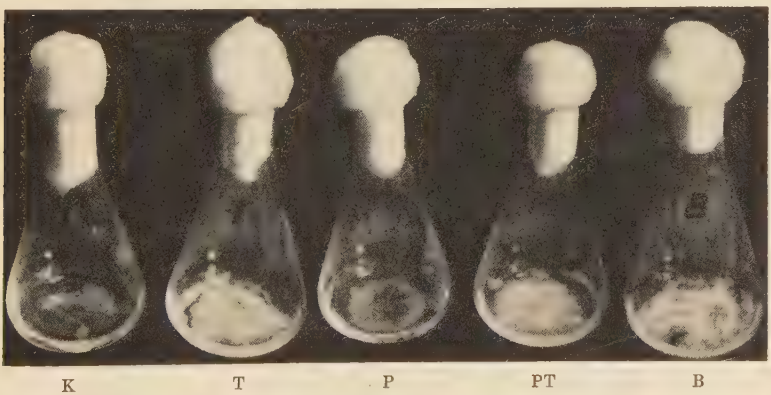


Abbildung 21.

Wachstum von *Mucor Ramannianus*.

K. Kontrolle auf aneurinfreier Nährlösung. T. mit Thiazol. P. mit Pyrimidin. PT. mit Pyrimidin und Thiazol. B. mit Aneurin.

Es bestanden somit folgende vier vergleichbare Lösungen :

Synthetische	Nährlösung	mit Aneurin	(B_1)
»	»	» Thiazol	(T)
»	»	» Pyrimidin	(P)
»	»	» Thiazol + Pyrimidin	(PT)

Die erhaltenen Resultate geben Abbildungen 21 und 22 wieder.

Für *Mucor Ramannianus* genügt das Thiazol zur Auslösung des Wachstums. Das Pyrimidin wirkt nicht. Aequimolekulare Konzentrationen von Aneurin, Thiazol plus Pyrimidin und Thiazol ergeben gleiche Myzelgewichte des Pilzes. Allerdings scheint die Wachstumsgeschwindigkeit auf Aneurin- oder Thiazolpyrimidinnährlösung etwas grösser zu sein als auf Thiazolnährlösung.

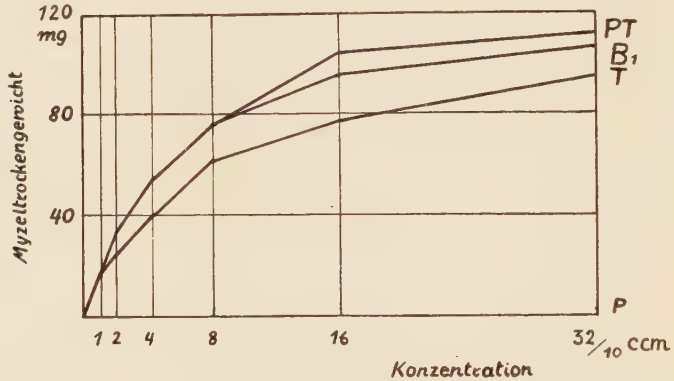


Abbildung 22.
Die Wirkung von Aneurin, Pyrimidin und Thiazol auf *Mucor Ramannianus*. 1 ccm entspricht 0,5 γ Aneurin oder Pyrimidin und 0,21 γ Thiazol.
B_1 = Aneurin, PT = Pyrimidin + Thiazol, P = Pyrimidin, T = Thiazol.

Dieses Verhalten von *Mucor Ramannianus* gegenüber den Aneurinkomponenten stellt einen seltenen Fall dar; es wurde bis dahin einzig noch bei den Flagellaten *Polytoma caudatum* (Lwoff und Dusi, 1937 c) und *Polytoma ocellatum* (Lwoff und Dusi, 1937 a) gefunden, währenddem heute eine viel grössere Zahl von Organismen bekannt ist, die auf Pyrimidin und Thiazol oder Pyrimidin allein positiv reagieren.

VIII. Die Identität zwischen M-Faktor und Thiazol für Mucor Ramannianus.

Die auffälligen Eigenschaften des Thiazols — Laugestabilität, Löslichkeit in Chloroform (R. R. Williams, 1938) — liessen vermuten, dass es sich bei den Wachstumsfaktoren der untersuchten

Extrakte zum Teil um Thiazol handelt. Es mussten nun die Eigenschaften des Thiazols und zum Teil auch des Pyrimidins mit denen der Extrakte verglichen werden.

A. Die Chloroformlöslichkeit des Thiazols.

Zur Bestimmung der Löslichkeit des Thiazols in Chloroform wurden 10 ccm wässerige Thiazollösung zu 2 γ/ccm mit gleichviel Chloroform durchgeschüttelt und die im Scheidetrichter getrennten Phasen (die Chloroformphase nach Ueberführung in Wasser) auf ihre Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus* geprüft. Das gleich gute Wachstum auf der Wasser- wie der Chloroformphase bewies die gute Löslichkeit des Thiazols in Chloroform wie in Wasser (Tabelle 31).

Tabelle 31.

Verteilung des Thiazols in einem Lösungssystem Chloroform-Wasser, Wachstum von *Mucor Ramannianus*.

Phase	0 ccm	0,5 ccm	1 ccm	2 ccm
Chloroformphase Myzelgewichte . . .	0	198	196	199 mg
Wasserphase Myzelgewichte . . .	0	205	206	190 mg

Ein ähnlicher Versuch wurde mit Pyrimidin durchgeführt. An Stelle von *Mucor Ramannianus* diente *Phycomyces* als Test. *Phycomyces* reagiert auf Thiazol plus Pyrimidin; zum Pyrimidinnachweis musste der Nährlösung somit noch Thiazol in Ueberschuss beigefügt werden. Der Versuch wurde in gleicher Weise wie mit Thiazol durchgeführt (Tabelle 32). Die Chloroformserie brachte hier nur ein geringes Pilzwachstum hervor; das Lösungsvermögen des Pyrimidins in Chloroform war also gegenüber dem im Wasser gering.

Tabelle 32.

Verteilung des Pyrimidins in einem Lösungssystem Chloroform-Wasser, Wachstum von *Phycomyces*.

Phase +0,5 γ Thiazol pro Kultur	Myzelgewichte			
	0 ccm	0,5 ccm	1 ccm	2 ccm
Chloroformphase . . .	8	9	13	15
Wasserphase	0	96	95	92

Thiazol ist somit sehr gut, Pyrimidin dagegen schwer chloroformlöslich.

B. Adsorption an Tierkohle.

100 γ Thiazol wurden 12 Stunden mit Tierkohle Merck kalt stehengelassen und dann filtriert. Das Filtrat hatte keine wachstumsfördernde Wirkung auf *Mucor Ramannianus* (Tabelle 33). Die Elution erfolgte durch ½stündiges Erhitzen der Kohle auf 80° C in einer Mischung von gleichviel 96%igem Alkohol und n/10 HCl. Das Eluat wurde mit NaOH neutralisiert, der Alkohol durch Abdampfen entfernt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Dieser wirkte auf *Mucor Ramannianus* wachstumsfördernd. Thiazol ist somit wie Aneurin an Tierkohle adsorbierbar und kann wie jenes durch Alkohol in saurem Milieu eluiert werden.

Tabelle 33.

Adsorption von Thiazol an Tierkohle.

Lösung	0,5 ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm	8 ccm
Filtrat	0	0	0	0	0
Eluat	107	134	134	143	121
Kontrolle	139	146	137	141	—

Eine weitere Probe zeigte, dass die Adsorption des Thiazols an Tierkohle in schwach saurem wie in alkalischem Milieu stattfindet.

C. Adsorption an Fullererde.

Aneurin ist bei pH 4,6 quantitativ an Fullererde adsorbierbar. Dagegen war eine quantitative Adsorption der wirksamen Faktoren aus Extrakten an Fullererde nicht möglich. Nun sollte das Verhalten von Thiazol, und zwar in verschiedener Wasserstoffionenkonzentration untersucht werden. Benützt wurde der Puffer von McIlvaine, bestehend aus sekundärem Natriumphosphat und Citronensäure. Für die Herstellung der pH 10 und 11 wurde ein Puffer nach Clark, aus NaOH und Na_2CO_3 bestehend, verwendet. — Je 25 g Fullererde wurden nun mit den gepufferten Thiazollösungen von je 100 ccm gemischt und 10 Stunden unter jeweiligem Aufschütteln stehengelassen. Dann wurden die dünnbreiigen Massen zentrifugiert (und teilweise filtriert), die erhaltenen Lösungen mit HCl resp. NaOH neutralisiert und auf die Wachstumsförderung von *Mucor Ramannianus* geprüft. Von einer Elution des an die Fullererde adsorbierten Thiazols wurde abgesehen (Tabelle 34).

Bei allen Werten unter pH 9 war eine starke Wirkung der Filtrate erhalten geblieben. Erst bei pH 10 zeigte sich eine teilweise und bei pH 11 eine vollständige Aufhebung der wachstumsfördernden Wirkung. Ob diese auf einer Adsorption des Thiazols oder auf einer Veränderung desselben in stark alkalischem Milieu beruhte, konnte aus dem Ver-

Tabelle 34.

Adsorption des Thiazols an Fullererde B. D. H. (British Drug House). Zu Versuchen verwendet wurde das Filtrat. Fehlendes Wachstum des Pilzes (*Mucor Ramannianus*) zeigt somit eine Adsorption an.

Filtratmenge		Adsorption bei pH									
ccm	γ	2	3	4,6	5	6	7	8	9	10	11
1/3	0,28	34	28	16	26	30	26	28	30	3	0
1	0,84	80	58	53	54	112	45	71	54	12	0
3	2,52	235	290	270	281	282	268	257	242	26	4
9	7,56	278	285	284	295	285	299	268	239	52	6

suche nicht bestimmt werden. Ferner bestand die Möglichkeit, dass bei alkalischem pH aus der Fullererde ein hemmender Stoff frei wurde, so dass die Adsorption nur eine scheinbare war. Der nachfolgende Versuch widerlegte aber diese Möglichkeit. Zu je 50 g Fullererde wurde das eine Mal 200 ccm gewöhnliches destilliertes Wasser, das andere Mal 200 ccm einer m/10-Na_2CO_3-Lösung, die ein pH von 11 aufweist, zugegeben und unter zeitweiligem Umschütteln 24 Stunden stehengelassen. Dann wurde aus beiden Lösungen von der klaren, gelblich gefärbten Oberschicht je 80 ccm abpipettiert, auf pH 6 eingestellt und je 10 ccm der Pilznährlösung zugesetzt, die als Wirkstoff in der einen Serie Aneurin, in der andern Serie Thiazol enthielt. Es waren somit vier verschiedene Versuchsglieder vorhanden :

Nährlösung + Thiazol		Nährlösung + Aneurin	
I.	II.	III.	IV.
Fullererdeauszug bei pH 11	Fullererdeauszug bei pH 7	Fullererdeauszug bei pH 11	Fullererdeauszug bei pH 7

Wäre nun bei pH 11 aus der Fullererde ein die Thiazolwirkung hemmender Stoff in die Lösung übergetreten, so müsste in den Kulturen mit diesem Zusatz das Wachstum von *Mucor Ramannianus* ausbleiben. Die Beobachtung zeigte nun, dass das Wachstum von *Mucor Ramannianus* in der Kontrolle II und IV etwas schneller einsetzte als in den Versuchen I und III. Später trat jedoch ein Ausgleich des Wachstums ein.

Bei pH 4,6 ist also Thiazol im Gegensatz zum Aneurin nicht an Fullererde adsorbierbar. Es sollte nun versucht werden, diese Eigenschaft zum Trennen der Aneurin- von der Thiazolwirkung auszunützen. Der Versuch wurde derart gemacht, dass je 100 γ Aneurin und Thiazol in je 20 ccm Wasser gelöst, zusammengeschüttet und bei pH 4,6 mit

Fullererde behandelt wurden. Ebenso wurden zur Kontrolle auch Aneurin rein und Thiazol rein, in gleicher Menge, einer Fullererdebehandlung unterworfen.

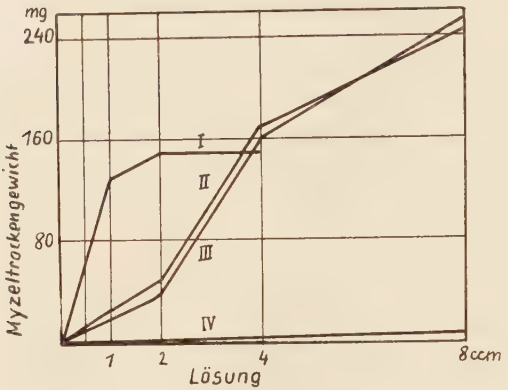


Abbildung 23.
Adsorption von Aneurin und Thiazol an Fullererde.
1. Aneurin, Kontrolle unbehandelt.
2. Thiazol an Fullererde adsorbiert, Filtratwirkung.
3. Mischung Aneurin-Thiazol an Fullererde adsorbiert, Filtratwirkung.
4. Aneurin an Fullererde adsorbiert, Filtratwirkung.

Es zeigte sich (Abbildung 23), dass die beiden Filtrate von reinem Thiazol und von der Mischung Thiazol-Aneurin genau dieselben Pilztrockengewichte erzeugten. Währenddem das Aneurinfiltrat keine Wachstumsförderung aufwies. Das heisst, dass aus der Mischung Aneurin-Thiazol bei pH 4,6 nur das Aneurin an Fullererde adsorbiert wird und dass damit eine Methode zur Trennung von Aneurin und Thiazol gegeben ist.

Anschliessend seien die Untersuchungen über die Adsorption des Pyrimidins an Fullererde besprochen. Die Versuche wurden wie mit Thiazol bei verschiedenen pH durchgeführt; die Pufferung geschah auf die gleiche Art, ebenfalls die Weiterbehandlung. Geprüft wurde auch hier nur das Filtrat. Als Test diente *Phycomyces*. Der Nährlösung wurde deshalb ausser dem zu prüfenden Filtrat, pro Kultur noch 0,4 γ Thiazol zugesetzt. Das Wachstum von *Phycomyces* blieb aber überall auf der Höhe der wirkstofffreien Kontrolle. Somit war das Pyrimidin von der Fullererde adsorbiert worden. In einer Mischung von Aneurin, Thiazol und Pyrimidin könnte also durch eine Fullererdeadsorption bei pH 4,6 das Thiazol im Filtrat abgetrennt werden.

D. Beständigkeit des Thiazols gegen Alkali.

Zu 40 ccm n/10-Natronlauge wurden je 2 ccm der Untersuchungslösung gegeben. 1 ccm derselben entsprach 20 γ Aneurin oder 8,19 γ Pyrimidin oder 8,48 γ Thiazol. Ein gleicher Versuch wurde kontrollweise mit Wasser statt NaOH angesetzt. Dann wurden die so vorbereiteten Lösungen eine Stunde im Autoclav auf 120° C erhitzt, nach dem Abkühlen mit HCl neutralisiert und den Kulturlösungen zugesetzt. Als

Testobjekte dienten *Mucor Ramannianus* für Aneurin und Thiazol, *Phycomyces* für Aneurin und Pyrimidin.

Tabelle 35.

Alkali- und Thermostabilität von Aneurin, Thiazol und Pyrimidin, 2 ccm Lösung entsprechen 1 γ Aneurin, 0,42 γ Thiazol und 0,41 γ Pyrimidin.

Lösung	Testobjekt	Myzeltrockengewichte				
		0 ccm	½ ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm
Aneurin:						
Kontrolle nicht erhitzt	Mucor Ramannianus	0	38	79	160	168
Wasserlösung erhitzt		0	43	66	120	126
NaOH-Lösung erhitzt		0	0	0	0	0
Aneurin:						
Kontrolle nicht erhitzt	Phycomyces	5	48	60	66	67
Wasserlösung erhitzt		0	48	60	72	72
NaOH-Lösung erhitzt		0	0	0	0	0
Thiazol:						
Kontrolle nicht erhitzt	Mucor Ramannianus	0	28	35	52	118
Wasserlösung erhitzt		0	28	40	60	114
NaOH-Lösung erhitzt		0	0	45	62	130
Pyrimidin:						
Kontrolle nicht erhitzt	Phycomyces	7	19	24	41	54
Wasserlösung erhitzt		0	0	55	59	59
NaOH-Lösung erhitzt		0	0	62	66	68

In den neutralen Lösungen erfuhr keine der untersuchten Substanzen, in den alkalischen Lösungen nur das Aneurin eine Zerstörung. In bezug auf die Alkalibeständigkeit stimmten somit die auf *Mucor Ramannianus* wirkenden Wachstumsfaktoren der Extrakte wie der MP-Faktor von Schopfer und Moser mit Thiazol, bzw. Thiazol plus Pyrimidin überein. (Schopfer und Jung, 1937; Sinclair, 1937; Müller und Schopfer, 1937.)

Das verschiedene Verhalten von Aneurin und seinen Komponenten Pyrimidin und Thiazol gegenüber Alkalien wurde in spätern Versuchen zur Trennung derselben verwendet, weshalb hier die Untersuchungen zur Ausarbeitung der Methode angefügt seien. Die Beständigkeit jeder der drei Substanzen bei verschiedenem Alkaligrad, in verschiedenen Erhitzungszeiten und bei verschiedenen Temperaturen wurde in einem Schachbrettversuch geprüft.

Tabelle 36.

Untersuchung der Einwirkung von Alkali und Hitze auf Aneurin. Test: *Phycomyces* (Optimum 0,4 γ/20 ccm).

Erhitzungsdauer auf 120°	Alkaligrad NaOH																	
	n			n/5			n/20			n/100			n/500			0		
Aneurindosis γ	1	4	14	1	4	14	1	4	14	1	4	14	1	4	14	1	4	14
120 Min.	12	14	57	7	9	26	2	11	20	10	18	50	10	20	67	89	87	80
60 Min.	7	10	56	4	8	38	3	8	33	9	14	33	5	18	55	—	—	—
30 Min.	1	8	—	5	11	50	4	14	30	—	8	12	6	16	48	—	—	—
10 Min.	3	14	36	8	8	31	8	16	42	—	9	12	1	11	31	—	—	—
30 Min./100°	6	9	53	7	10	41	10	18	81	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0 Min. erhitzt	81	81	—	—	—	—	—	—	—	86	76	—	—	—	—	—	—	—

Beim Aneurin bestätigte sich die bekannte Tatsache (G r e w e, 1937), dass schon bei niedriger Temperatur eine schwache Alkalinität eine Zerstörung desselben verursacht.

Für das Thiazol ergab sich (Tabelle 37), dass auch die intensivste Alkalizugabe und Hitzeeinwirkung keine Schädigung der wachstumsfördernden Wirkung zur Folge hatte. Auch übte das durch die Neutralisation mit HCl entstehende Kochsalz keine Hemmung auf das Pilzwachstum aus.

Tabelle 37.

Untersuchung der Einwirkung von Alkali und Hitze auf Thiazol. Test: *Mucor Ramannianus* (Optimum 0,6 γ/20 ccm).

Erhitzungsdauer auf 120°	Alkaligrad NaOH														
	n			n/5			n/20			n/100			0		
Thiazoldosis in γ	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4
120 Minuten	64	97	75	78	80	89	55	90	102	56	79	85	—	—	—
60 »	67	99	—	64	99	118	64	91	120	52	80	114	—	—	—
30 »	67	90	70	61	79	90	68	85	101	66	101	71	—	—	—
10 »	54	118	60	54	99	—	61	90	81	48	77	74	—	—	—
0 »	50	70	76	—	—	—	—	—	—	—	—	—	54	74	68

Als Testpilz für dieselben Versuche mit Pyrimidin diente wiederum *Phycomyces*, indem jedem Erlenmeyerkulturkolben noch 0,5 γ Thiazol

zugefügt wurde. Auch Pyrimidin blieb gegenüber jeder Behandlung widerstandsfähig.

Tabelle 38.

Untersuchung der Einwirkung von Alkali und Hitze auf Pyrimidin. Testpilz: *Phycomyces* (Optimum 0,2 γ/20 ccm).

Erhitzungsdauer auf 120°	Alkaligrad NaOH														
	n			n/5			n/20			n/100			0		
Pyrimidindosis in γ[1]	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4	1/4	1	4
120 Minuten	58	83	90	67	77	93	68	77	82	72	77	76	Kontrolle		
60 »	74	79	86	69	70	78	63	76	85	—	72	84	nur Thiazol		
30 »	64	85	91	—	—	—	75	74	88	73	78	83	9	10	10
10 »	68	82	89	68	82	89	62	79	73	72	81	77			
0 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	72	81	84

[1] Dazu pro Erlenmeyerkolben 0,5 γ Thiazol.

E. Ergebnisse.

1. Die Eigenschaften des Aneurins und seiner Komponenten. Trennungsmethoden.

Charakteristische Eigenschaften des Thiazols sind seine Alkalibeständigkeit, die gute Löslichkeit in Chloroform und die Nichtadsorbierbarkeit an Fullererde bei pH 4,6. Pyrimidin weist ebenfalls völlige Alkalibeständigkeit auf, ist aber in Chloroform schlecht löslich und bei pH 4,6 an Fullererde adsorbierbar. Das Aneurin unterscheidet sich vor allem durch seine Alkaliunbeständigkeit von seinen Komponenten. Die Unlöslichkeit in Chloroform und die Adsorbierbarkeit an Fullererde bei pH 4,6 unterscheiden es scharf vom Thiazol, nicht aber vom Pyrimidin.

Zur Abtrennung des Thiazols von Aneurin und Pyrimidin kann somit eine Adsorption an Fullererde in Frage kommen; das Thiazol bleibt im Filtrat zurück. Eine weitere, sehr einfache Möglichkeit besteht in der Ausschüttung des wässerigen Gemisches mit Chloroform. Auf diese Weise kann der Mischung das Thiazol fast rein entzogen werden.

Zur Abtrennung des Aneurins aus einer Mischung besitzen wir nach unseren Untersuchungen keine Möglichkeit, da es mit dem Pyrimidin zusammengeht. Hingegen kann es in einem Gemisch durch Alkalibehandlung zerstört werden, so dass nur seine Komponenten zurückbleiben. Ein Rückschluss auf das vorhanden gewesene Aneurin ist indirekt möglich, indem vorerst mit dem biologischen Test (*Phycomyces, Mucor Ramannianus*) die Gesamtmenge der Wachstumsfaktoren bestimmt wird. Nach erfolgter Alkalibehandlung wird die Wirkstoffmenge von neuem bestimmt; sie entspricht nun dem Thiazol und Pyrimidin. Die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Bestimmung

entspricht dagegen dem zerstörten Anteil, dem Aneurin. In Extrakten hat es sich als günstig erwiesen, eine NaOH-Konzentration von n/10 anzuwenden, da durch die Begleitstoffe oft ein Teil der Lauge verbraucht wird und dann die Gefahr besteht, dass sie nicht ausreicht zur vollständigen Zerstörung des Aneurins.

2. Der Faktor MP.

Die alkalistabilen Wachstumsfaktoren der Extrakte sind Seite 212 unter der Bezeichnung MP-Faktor zusammengefasst worden. Die Uebereinstimmung ihrer Eigenschaften mit denen der Aneurinkomponenten lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass sie für *Mucor Ramannianus* mit dem Thiazol wenigstens teilweise identisch sind. Anders muss es sich mit dem MP-Faktor für *Phycomyces* verhalten; *Phycomyces* benötigt als Wachstumsfaktoren Thiazol und Pyrimidin. Der MP-Faktor muss also für diesen Pilz zum Teil aus Thiazol plus Pyrimidin bestehen (Schopfer und Jung, 1937; Sinclair, 1937). Wenn diese Annahme richtig ist, so muss aber die Chloroformlöslichkeit des MP-Faktors für *Phycomyces* negativ sein, was von Schopfer auch beobachtet worden ist (Schopfer, 1939). Für Pyrimidinorganismen muss demzufolge der MP-Faktor nur aus Pyrimidin bestehen.

IX. Die Zerlegung des Aneurins in seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol durch Hitze. Der Aneuringehalt der Extrakte.

A. Die Umwandlung von laugeunbeständigen in laugebeständige Extraktfaktoren in der Hitze.

Erhitzt man einen aneurinhaltigen pflanzlichen Extrakt während 5 Stunden auf 130°, so hat er seine Wirksamkeit auf das Tier vollständig eingebüsst, währenddem er auf *Phycomyces* bzw. *Mucor Ramannianus* voll wirksam bleibt (Schopfer und Jung, 1937). Man muss hier annehmen, dass dabei das Aneurin in Faktoren umgesetzt wird, die wohl noch auf die erwähnten Mucorineen, aber nicht mehr auf die Ratte wirksam sind.

Nun war beobachtet worden, dass der laugestabile Anteil der Extraktwirkstoffe je nach der Vorbehandlung der Extrakte verschieden gross ist. In einem Versuch war ein Reiskleieauszug durch zweistündiges Erhitzen auf 100° hergestellt worden (Lösung III). Davon wurde die Hälfte einer Laugebehandlung (NaOH n/10, 120° während einer Stunde) unterworfen (Lösung IV). Anderseits wurde versucht, die Totalwirkung eines Auszuges und die Pyrimidin-Thiazolwirkung derart zu ermitteln, dass Reiskleie direkt einerseits mit destilliertem Wasser (Lösung I) und anderseits mit NaOH n/10 (Lösung II) eine Stunde bei 120° extrahiert wurde. Ein Vergleich der Resultate (siehe Abbildung 24)

zeigte nun, dass die nach dem Auszug in Heisswasser alkalibehandelte Lösung (IV) einen bedeutend grössern Wirkstoffgehalt aufwies als der direkte alkalische Auszug (II), obschon sich die Kontrollen (I und III) ungefähr in ihrer Wirksamkeit deckten. Damit war die Frage gestellt, ob die laugelabilen Wachstumsfaktoren vielleicht unter gewissen Bedingungen in laugestabile übergeführt würden.

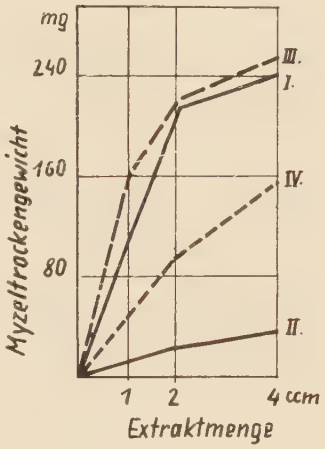


Abbildung 24.
Die Wirksamkeit alkalibehandelter Extrakte aus Reiskleie, nach verschiedener Vorbehandlung. Erklärung im Text. I und III = wässerige Auszüge, II = Auszug in Lauge, IV = Auszug in Wasser mit nachfolgender Laugenbehandlung.

Nun wurde ein durch ganz kurzes Aufkochen hergestellter Extrakt aus *Pisum*samenmehl in folgender Weise behandelt: die eine Hälfte davon wurde vorerst im Autoclav 6 Stunden auf 130° erhitzt; dann wurde die erhitzte und die unbehandelte Lösung wiederum halbiert und je die Hälfte einer einstündigen Lauge-Hitzebehandlung unterworfen (NaOH n/10, 120° C). Nach der Neutralisierung der Lösungen wurden sie mitsamt den Kontrollen auf ihre Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus* geprüft. Es waren also vorhanden:

I. Kontrolle: Unbehandelter Extrakt.
II. Extrakt sechs Stunden auf 130° erhitzt.
III. Extrakt eine Stunde mit NaOH n/10 auf 120° erhitzt.
IV. Extrakt vorerst sechs Stunden auf 130°, dann mit NaOH n/10 eine Stunde auf 120° erhitzt.

Es zeigte sich eindeutig, dass durch eine blosse Hitzebehandlung der Extrakte deren Wirksamkeit kaum vermindert wurde; durch eine Laugebehandlung dagegen wurde die Wirksamkeit stark herabgesetzt, auf rund einen Viertel (Tabelle 39). Dieser Anteil hätte somit dem Thiazol entsprochen. Wurde dagegen der hitzebehandelte Extrakt einer Laugebehandlung unterworfen, so blieb seine Wirksamkeit sozusagen unverändert gegenüber der Kontrolle. Es musste somit durch die blosse mehrstündige Erhitzung des Extraktes auf 130° der laugezerstörbare

Tabelle 39.

Wirksamkeit eines Extraktes aus Pisum auf *Mucor Ramannianus* nach verschiedener Behandlung.

	Behandlung der Extrakte	Myzelgewichte von *Mucor Romannianus*			
		1/2 ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm
I	Kontrolle (Extrakt unbehandelt) .	9	30	26	66
II	Extrakt 6 Std. auf 130° erhitzt . .	7	14	25	69
III	» 1 » NaOH n/10, bei 120°	3	5	7	19
IV	» 6 » auf 130°, dann 1 Std. NaOH n/10 bei 120°	10	12	23	55

Anteil in einen laugeunzerstörbaren Stoff verwandelt worden sein. Der Versuch mit andern Extrakten wiederholt, ergab das gleiche Resultat.

Nun wurde für dieselben Versuche als Test auch *Phycomyces* verwendet, um zu erfahren, ob der in der Hitze entstandene Stoff auch auf ihn wirksam sei. Es wurde dazu der gleiche Extrakt aus Erbsen verwendet wie für *Mucor Ramannianus* (Abbildung 25).

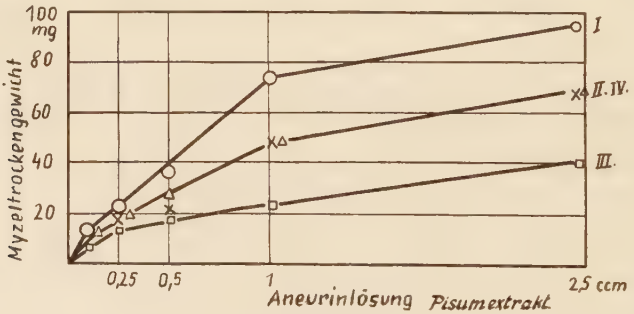


Abbildung 25.

Der Einfluss der Hitzebehandlung auf die Alkalistabilität der Wachstumsfaktoren in Pisumextrakt. 1. Kontrolle, 2. Hitzebehandlung, 3. Laugebehandlung, 4. Hitze-, dann Laugebehandlung. Testpilz : *Phycomyces.*

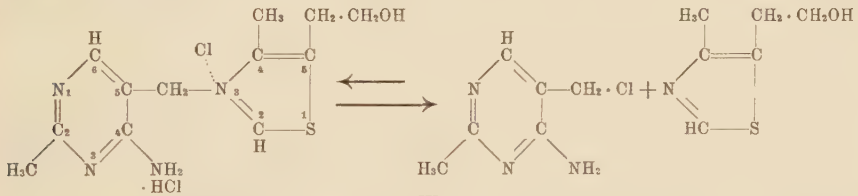
Das Ergebnis war mit dem von *Mucor Ramannianus* vollständig übereinstimmend. Durch die reine Hitzebehandlung sank hier die Wirksamkeit auf etwa 50 % der Kontrolle; durch die blosse Laugebehandlung dagegen auf etwa 25 %. Eine Lauge- nach der Hitzebehandlung verminderte die Wirksamkeit der Extrakte nicht mehr. Die beiden Kurven (II und IV) decken sich. Somit mussten durch die Hitzebehandlung alkalistabile Wachstumsfaktoren entstanden sein.

Genau zu denselben Ergebnissen führten Untersuchungen an Orypan, Weizenkeimextrakt usw.

Diese Umsetzung alkaliunbeständiger in alkalibeständige Wachstumsfaktoren legte nun den Schluss nahe, dass es sich dabei um eine Aufspaltung des Aneurins in seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol handelt. Da das Tier (Ratte) nicht imstande ist, an Stelle des Aneurins Pyrimidin plus Thiazol zu verwerten, wohl aber die hier in Frage stehenden Mikroorganismen, wäre damit zugleich eine Erklärung für das verschiedene Verhalten von Tier und Mikroorganismen gegenüber hitzebehandelten Pflanzenextrakten gegeben.

B. Versuche zur Umsetzung von synthetischem Aneurin in Pyrimidin und Thiazol.

Das Aneurin (siehe G r e w e , 1937) besteht aus einem fünfgliederigen Thiazolring und einem sechsgliederigen Pyrimidinring, der durch eine CH_2-Gruppe an das Stickstoffatom des Thiazols gebunden ist. Die fünfte Valenz des Stickstoffs wird dabei durch ein Chloratom besetzt. Eine wässerige Lösung von Aneurin zeigt im Absorptionssektrum eine Doppelbande, währenddem eine Lösung in n/200 HCl nur ein Absorptionsmaximum bei 247 mμ aufweist. Diese Tatsache zeigt an, dass das Aneurin in reinem Wasser dissoziiert. Die Dissoziation erfolgt nach der Formel



IV.

Es besteht somit ein Gleichgewicht zwischen Aneurin einerseits und Pyrimidin und Thiazol anderseits. Wird nun die eine Komponente der Lösung dauernd entzogen, so tritt eine Verschiebung des Gleichgewichts ein und es muss möglich werden, in dieser Weise Aneurin in Thiazol und Pyrimidin überzuführen. So hat W i l l i a m s durch Bildung des unlöslichen Pyrimidinsulfits die Spaltung des Aneurins in seine beiden Komponenten erstmals beobachtet.

Eine Erhitzung des Aneurins während mehrerer Stunden auf 125° C hat eine Aufhebung der vitaminischen Wirkung auf das Tier (Ratte) zur Folge; dagegen bleibt die wachstumsfördernde Wirkung auf Mikroorganismen erhalten. Wenn es sich dabei um eine Spaltung des Aneurins in die Pyrimidin- und Thiazolkomponente handelte, so müsste allerdings mit der Gleichgewichtsverschiebung in der Hitze eine Reaktion verbunden sein, die eine Rückkehr der Spaltprodukte in die Ausgangssubstanz verhinderte. Dabei brauchten jedoch nicht ausschliesslich die

bisher hier verwendeten Substanzen zu entstehen; gewisse Seitenketten des Pyrimidins und Thiazols dürfen Veränderungen erfahren, ohne dass dadurch die Wirkung auf *Phycomyces* und andere Mikroorganismen aufgehoben wird (Schopfer, 1939), z. B. Ersatz der endständigen NH_2-Gruppe der Seitenkette in 5-Stellung des Pyrimidins durch einen Cl-, Br-, OH-, OEt-Rest.

Einen gewissen Einblick in die Umsetzungen in der Hitze kann vielleicht auch die Laugestabilität der entstehenden Produkte bieten. Der Angriff der Lauge auf das Aneurinmolekül erfolgt an der Thiazolkomponente. Das Thiazol ist nur laugestabil, wenn das Stickstoffatom im Thiazolkern dreiwertig ist, oder wenn in der Thiazoloniumverbindung der zwischen N und S des Thiazolkerns liegende Kohlenstoff (2) einen Substituenten trägt. Die Laugestabilität verlangt also, dass das Aneurin in der Hitze entweder in seine Komponenten zerfallen ist, oder dass eine Substitution an dem erwähnten Kohlenstoffatom eingetreten ist. Nun ist aber bekannt, dass durch eine solche Substitution nicht nur die Oxydation zu Thiochrom unmöglich wird, sondern dass das Aneurin auch seine Wirkung auf *Phycomyces* und andere Mikroorganismen verliert. Somit kommt nur eine Aufspaltung in Frage. Durch geeignete Löslichkeits- und Adsorptionsversuche müssen die Spaltprodukte getrennt nachzuweisen sein.

1. Versuche zur Spaltung des synthetischen Aneurins in der Hitze.

In einigen ersten Versuchen wurde das reine Aneurin während der Hitzebehandlung fast vollständig vernichtet, so dass es seine Wirksamkeit auch auf Pilze eingebüsst hatte. Von dieser Tatsache ausgehend, versuchten wir nun, Bedingungen zu schaffen, in denen eine Umwandlung des Aneurins, aber keine Zerstörung der Wirksamkeit auf die Testpilze stattfand.

a) Der Einfluss von pflanzlichen Extraktstoffen.

Ein Reiskleieextrakt wurde vorerst einer Adsorption an Tierkohle unterworfen; das Filtrat, das nach der Adsorption der Wirkstoffe an die Kohle auf *Mucor Ramannianus* unwirksam war, wurde nun einer synthetischen Aneurinlösung zugefügt. Die Lösung wurde dann samt einer reinen Aneurinkontrollösung je zur Hälfte 6 Stunden auf 125° erhitzt. Dann folgte eine Laugebehandlung je der Hälfte aller hitzebehandelten und Kontrollösungen, indem man diese mit soviel Natronlauge versetzte, dass eine n/20-Lösung entstand, und dann eine Stunde auf 120° erhitzte. Die Neutralisation erfolgte mit HCl. Somit waren, wie bei den Extrakten, von jedem Ausgangsprodukt vier verschiedene Lösungen vorhanden.

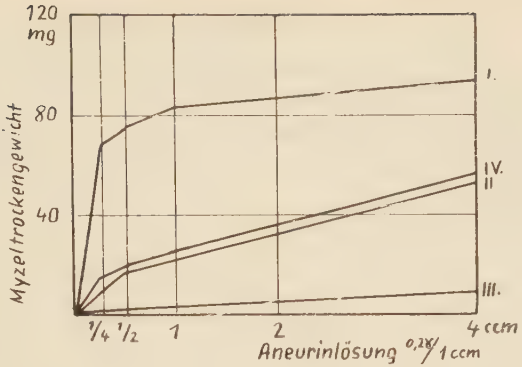


Abbildung 26.
Einfluss der Hitze auf das reine Aneurin. *Phycomycestest.*
1. Kontrolle. 2. 6 Stunden auf 125° erhitzt. 3. 1 Stunde mit n/10 NaOH auf 120° erhitzt. 4. Behandlung 2 plus 3.

(I) Die unbehandelte Kontrollösung.
(II) Die hitzebehandelte Lösung.
(III) Die laugebehandelte nichterhitzte Lösung.
(IV) Die lauge- und hitzebehandelte Lösung.

Diese Lösungen wurden nun in ihrer Wirkung auf *Phycomyces* und *Mucor Ramannianus* geprüft. *Phycomyces* wurde gewählt, weil er beide und nicht nur die eine Aneurinkomponente benötigt. Wiedergegeben werden deshalb auch nur die *Phycomyces*werte. Die Resultate stimmten mit den Ergebnissen an den Extrakten überein (Abbildungen 26 und 27).

Das reine synthetische Aneurin wurde durch die Hitze zum Teil zerstört. Der nicht zerstörte Anteil war durch eine nachherige Behand-

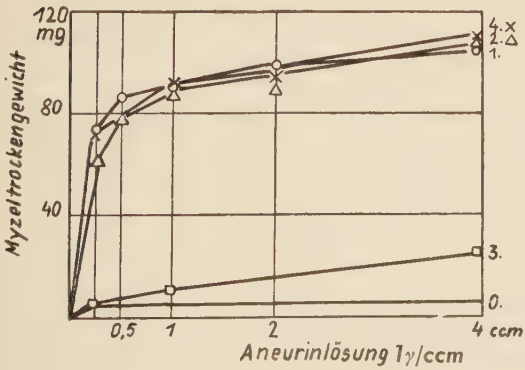


Abbildung 27.
Einfluss der Hitze auf synthetisches Aneurin in Reiskleie-Tierkohlefiltrat. *Phycomycestest.*
1. Kontrolle. 2. 6 Stunden auf 125° erhitzt. 3. Eine Stunde mit n/10 NaOH auf 120° erhitzt. 4. Behandlung 2 plus 3. 0. Filtrat ohne Aneurin.

lung in alkalischer Lösung nicht weiter zerstörbar. Dasselbe zeigte sich für das Aneurin in Reiskleie-Tierkohlefiltrat. Hier verminderte die Hitze allein die Wirkung auf *Phycomyces* nicht. Eine nachherige Laugebehandlung hatte ebenfalls keinen Einfluss, währenddem sie ohne vorherige Hitzebehandlung die wachstumsfördernde Wirkung weitgehend aufhob.

b) Einfluss der H-Ionenkonzentration.

Es stellte sich nun die Frage, ob die beobachtete Umwandlung der laugelabilen in laugestabile Stoffe vielleicht die Folge einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration war. In alkalischem Milieu fällt das Aneurin einer vollständigen Zerstörung anheim; in schwacher Salzsäure soll dagegen eine Hydrolyse der freien NH_2-Gruppe am Pyrimidinkern stattfinden und ein auch auf die Mikroorganismen unwirksames Produkt entstehen (Ruhkopf; s. Grewe, 1937).

Einige Proben Aneurin wurden in verschieden aufgebaute Pufferlösungen von verschiedenen pH gebracht und vier Stunden auf 120° erhitzt. Nachher wurde je die Hälfte der Lösungen neutralisiert, dann mit NaOH n/10 versetzt und eine Stunde auf 120° erhitzt. Endlich wurden alle Lösungen auf pH 6 gebracht und zu Kulturen verwendet.

Tabelle 40.

Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Aneurin.
Testobjekt: *Phycomyces.*

Behandelte Lösung	Myzelgewichte			Puffer
	1 ccm	2 ccm	4 ccm	
Kontrolle: Aneurin ungepuffert erhitzt	67	63	64	
pH 2: Nur Hitzebehandlung	64	66	66	n/5 HCl 15 ccm +
Hitze-, dann Laugebehandlung	35	57	65	n/5 KCl 50 ccm .
pH 2,2: Hitzeeinwirkung	57	52	76	Phosphat-Citrat
Hitze-, dann Laugeeinwirkung	59	65	70	(Mc Ilvaine)
pH 6: Hitzebehandlung	58	67	66	Na-phosphat sek.
Hitze-, dann Laugebehandlung	48	65	65	K-phosphat prim.
pH 7: Hitzebehandlung	21	40	61	Phosphat-Citrat
Hitze-, dann Laugebehandlung	24	35	55	(Mc Ilvaine)

Durch die blosse Einwirkung der Hitze wurde weder bei pH 2 noch bei pH 6 eine Wirkungsverminderung erreicht. Dagegen wurde bei pH 7 eine starke Abnahme der Wirkung (auf rund ¼) erzielt, wohl wegen des Uebergangs zum alkalischen Milieu. Auch der HCl-Puffer schien hier keine Zerstörung des Aneurins zu verursachen. Eine nachfolgende Behandlung mit Alkali vermochte nirgends die Wirksamkeit weiterhin zu zerstören; einzig im HCl-Puffer war die Wirksamkeit herabgesetzt worden. Es mussten somit in allen untersuchten Lösungen alkalistabile Wachstumsfaktoren gebildet worden sein. Die Wasserstoffionenkonzentration schien dabei keine Rolle zu spielen.

c) Einfluss der Erhitzungsdauer.

Bei den Untersuchungen über den Einfluss verschieden langer Erhitzungszeiten auf Aneurin stellten sich die Fragen :

1. Wie gross ist der Anteil des unveränderten Aneurins ?
2. Wie gross ist der Anteil, der in eine wirksame, laugestabile Form übergeht ?

Der laugestabile Anteil war leicht zu bestimmen. Dagegen musste das erhaltengebliebene Aneurin berechnet werden aus der Differenz zwischen der gesamten Wirkung der Lösung (II) und der Wirkung nach einer Laugebehandlung (III). Ebenso konnte der zerstörte und unwirksame Anteil aus der Differenz der Kurven I (Kontrolle) und II ermittelt werden.

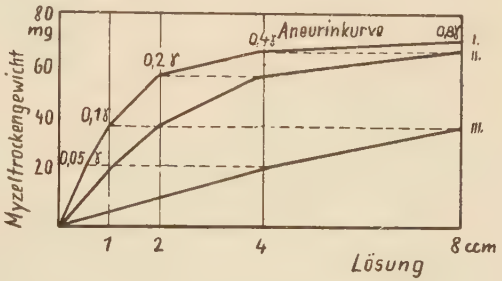


Abbildung 28.
Schematische Darstellung der Berechnung des Aneuringehaltes einer Lösung.
I. Kontrolle.
II. Totalwirkung nach Hitzebehandlung : ½ von I.
III. Wirkung nach einer Laugebehandlung von II : ¼ von II.

Nahm man eine Zerlegung des Aneurins in eine Thiazol- und eine Pyrimidinkomponente an, so war damit gleichzeitig eine Oxydation — das heisst der Ringschluss — zu Thiochrom verunmöglicht. Es konnte hier somit die Thiochrommethode nach Jansen (Karrer) zur Aneurinbestimmung verwendet werden, um den Zerfall des Aneurins zu bestimmen.

Aneurinlösungen zu 4 γ pro 1 ccm Lösung wurden nun verschiedene Zeiten auf 130° erhitzt und in der beschriebenen Art untersucht. Eine Zusammenstellung der Werte gibt Tabelle 41. Als Test wurde *Phycomyces* verwendet.

Der Versuch zeigt, dass durch die Hitzeeinwirkung keine Verminderung der Wirksamkeit auf *Phycomyces* stattgefunden hat. Die Einwirkung der Lauge verursachte in der Kontrolle eine praktisch vollständige Zerstörung der Wirksamkeit. Nach einer Hitzeeinwirkungszeit von 15 Minuten war schon ein Teil, vielleicht ein Viertel, durch Lauge nicht mehr zerstörbar. Nach einer Hitzeeinwirkung von 30 Minuten schien schon eine weitgehende Laugebeständigkeit erreicht zu sein. Allerdings erreichten die Myzelgewichte nicht die der Kontrollen; doch war das auch nach einer 8stündigen Hitzeeinwirkung nicht der Fall,

Tabelle 41.
Die Aneurinspaltung als Funktion der Erhitzungsdauer.

	Erhitzungsdauer						
	0	15′	30′	60′	2 Std.	4 Std.	8 Std.
a) Phycomycestest							
Aneurindosis: Hitze (II)							
1,6 γ	67	72	70	69	65	71	65
4,0 γ	70	72	72	70	69	71	72
8,0 γ	75	73	72	69	69	72	72
Lauge (III)							
1,6 γ	9	24	58	31	50	51	58
4,0 γ	—	52	65	65	60	61	64
8,0 γ	13	58	66	66	65	67	64
b) Thiochromtest in γ							
Aneurindosis 1,6 γ berechnet	1,6	1,2	1,0	0,9	0,3	0,1	weniger
Aneurindosis 4,0 γ berechnet	4	3	2,5	2,2	0,75	0,25	weniger
Aneurindosis 8,0 γ gemessen	8	6	5	4,5	1,4	0,5	weniger

weshalb auf eine gewisse Hemmung des Pilzes geschlossen werden muss. Vergleicht man nun die Thiochromwerte, so zeigen diese eine stetige Abnahme während vier Stunden. Nach diesen Werten dürfte die Laugestabilität in den Anfangszeiten noch nicht den vollen Wert erreicht haben. Nun waren aber die im Versuch zugesetzten Wirkstoffdosen zu gross gewählt worden, so dass die optimale Konzentration schon bei einer nicht vollständigen Laugestabilität erreicht worden war.

d) Einfluss von Metallen.

Die Zerstörung der Wirkung des Aneurins auf Mikroorganismen durch mehrstündiges Erhitzen hatte während der Durchführung dieser Versuche sehr verschiedene Werte erreicht. Es mussten hier noch gewisse unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Gegenüber den ersten Hitzeversuchen bestand nun eine Milieuveränderung darin, dass nicht mehr dasselbe destillierte Wasser verwendet wurde. Die früheren Versuche wurden mit Wasser durchgeführt, das in einem eisernen Destillationsapparat mit Kupferkühler gewonnen worden war; zu den jetzigen Versuchen dagegen wurde Wasser verwendet, das in einem vollständig aus Pyrexglas bestehenden Apparat destilliert wurde. Es war nun die Frage, ob gewisse Metallionen einen Einfluss auf die Art der Reaktion des Aneurins in der Hitze ausüben könnten. Es wurde deshalb ein orientierender Versuch über den Einfluss des Eisens während der Er-

hitzung des Aneurins durchgeführt. Der zu behandelnden Aneurinlösung von 40 γ in 40 ccm Wasser wurde ein kleines Stücklein blankes Eisen beigegeben (I). Ein Kontrollversuch wurde derart durchgeführt, dass auch Wasser mit Eisen erhitzt und dann dem unbehandelten Aneurin zugefügt wurde (III).

Tabelle 42.

Einfluss des Eisens auf das in Lösung erhitzte Aneurin.

Behandlung	Hitzebehandlung			Laugebehandlung nach Hitzebehandlung		
	1 ccm	2 ccm	4 ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm
I. a) Aneurinlösung mit Fe 120 Min. auf 120° C	Sp	10	24	8	11	12
II. Aneurin rein, 120 Min. auf 120°	35	58	70	18	39	52
III. Wasser mit Fe erhitzt wie a, dann Aneurinzugabe	47	71	77	—	Spur	—
IV. Kontrolle: Aneurin rein	54	80	84	—	Spur	—

Das in Gegenwart von Eisen erhitzte Aneurin hatte seine Wirksamkeit auf *Phycomyces* weitgehend eingebüsst (I), währenddem diejenige der ohne Eisen erhitzten Probe nur um einen geringen Teil vermindert worden ist (II). Dass die Erscheinung nicht auf einer Hemmung des Pilzes durch Eisenionen beruht, wird durch das gute Wachstum auf einer Mischung von unbehandeltem Aneurin und eisenbehandeltem Wasser (III) bewiesen. Ob nun aber in Gegenwart des Eisens in der Hitze derselbe Vorgang stattgefunden hat, durch den das Aneurin in frühern Versuchen zeitweilig zerstört worden ist, kann hier nicht entschieden werden.

2. Versuche zum Nachweis der durch thermische Spaltung des Aneurins entstandenen Wirkstoffe.

Wichtig war jetzt die Frage, in welche wirksamen Stoffe das Aneurin in der Hitze übergeht. Es musste nun versucht werden, an Hand der Eigenschaften der aus dem reinen synthetischen Aneurin in der Hitze entstandenen Stoffe eine vorläufige Bestimmung vorzunehmen. Es wurde versucht, mit den gewonnenen Vergleichs- und Trennungsmethoden die Eigenschaften von Pyrimidin und Thiazol in der hitzebehandelten Aneurinlösung festzustellen.

a) Löslichkeit in Chloroform.

200 γ Aneurin in 10 ccm Wasser wurden vier Stunden auf 130° C erhitzt. Dann wurde die Lösung auf 20 ccm ergänzt, mit Chloroform längere Zeit durchgeschüttelt und im Scheidetrichter wieder von der

Chloroformphase getrennt. Derselbe Versuch wurde mit nicht erhitztem Aneurin als Kontrolle ebenso durchgeführt. Dann kamen in gewohnter Weise die verschiedenen Lösungen in steigender Menge zu Kulturlösungen für *Mucor Ramannianus* und *Phycomyces*. Die Resultate wiesen ganz eindeutig darauf hin, dass in der Hitze ein chloroformlöslicher Stoff entstanden war, der auf *Mucor Ramannianus* fördernd wirkte. Dagegen war die Wirkung auf *Phycomyces* eine sehr mässige. Erhielten aber die *Phycomyces*kulturen noch eine Zugabe von Pyrimidin, auf das allein *Phycomyces* nicht reagiert, so stieg das Wachstum stark an (Tabelle 43).

Tabelle 43.

Nachweis eines chloroformlöslichen Faktors. *Phycomycestest.*

Phase	1/20 ccm	1/8 ccm	1/4 ccm	1/2 ccm	1 ccm	2 ccm
Autoclav-Aneurin						
Wasserphase	—	70	72	75	—	—
Chloroformphase . . .	61[1]	10	73[1]	22	68[1]	56
Kontrollaneurin						
Wasserphase	—	70	70	75	—	—
Chloroformphase . . .	3	3	4	8	11	17
Pyrimidin allein . . .	kein Wachstum über eine Kontrolle					

[1] In diese Kulturen wurde Pyrimidin zugesetzt!

Wie früher festgestellt wurde, geht bei dieser Behandlung Thiazol zur Hälfte in die Chloroformphase, Pyrimidin dagegen nur zu einem kleinen Teil. Somit bezeugte das stark erhöhte Wachstum von *Phycomyces* bei einer Pyrimidinzugabe zur Lösung, dass die andere Komponente — Thiazol — in genügender Menge vorhanden war, nicht aber Pyrimidin.

Tabelle 44 gibt die Werte wieder, die *Phycomyces, Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* lieferten. Die Tabelle zeigt, dass durch die Einwirkung der Hitze die Wirksamkeit der Stoffe auf *Mucor Ramannianus* nur um wenig abgenommen hatte, ebenso auf *Phycomyces* und *Rhodotorula rubra*. Der chloroformlösliche Anteil im unerhitzten Aneurin war null, im erhitzten Aneurin dagegen etwa 50% der Gesamtwirkung; er wirkte auf *Mucor Ramannianus* unmittelbar, auf *Phycomyces*, wenn ihm Pyrimidin zur Verfügung stand, und auf *Rhodotorula* überhaupt nicht.

Mucor Ramannianus benötigt nur Thiazol, *Phycomyces* dazu noch Pyrimidin, das in der erhitzten Aneurinlösung, nicht aber in der Chloroformphase daraus vorhanden war. *Rhodotorula rubra* reagiert auf Pyrimidin allein und konnte sich infolgedessen auf den Chloroformphasen nicht entwickeln. *Alle drei Organismen weisen in ihrem Verhalten deut-*

Tabelle 44.

Nachweis des Thiazols im hitzebehandelten Aneurin.

Ursprüngliche Aneurinkonzentration 1 γ/ccm	Mucor Ramannianus				Phycomyces				Rhodotorula rubra
	0.1 ccm	0,2 ccm	0,4 ccm	0 8 ccm	0,1 ccm	0,2 ccm	0,4 ccm	0,8 ccm	
Unbehandeltes Aneurin									
Kontrolle	12	35	60	110	34	57	75	75	Wachstum gut
Chloroformphase . .		0		0		0 [1]		0 [1]	kein Wachstum
Autoclav-Aneurin									
Totale Wirkung . .	12	37	54	87	—	52	65	73	Wachstum gut
Chloroformphase . .	—	24	27	52	—	30 [1]	48 [1]	63 [1]	kein Wachstum

[1] Nach Zugabe von Pyrimidin 0,5 γ/20 ccm.

lich darauf hin, dass die erhitzte Aneurinlösung aus Pyrimidin und Thiazol besteht. — Somit ist das Aneurin in den MP-Faktor übergegangen.

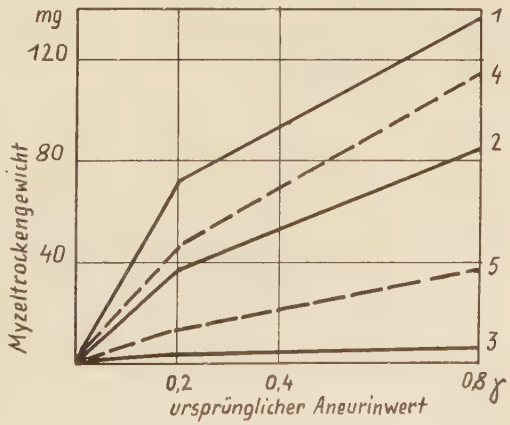
b) Adsorption an Fullererde.

66 γ hitzebehandeltes Aneurin in 50 ccm Wasser, mit dem Citronensäurephosphatpuffer von Mc Ilvaine, auf pH 4,6 eingestellt, wurde an Fullererde Merck adsorbiert und das Filtrat geprüft mit *Phycomyces* und *Mucor Ramannianus*. Bestand die Lösung aus Pyrimidin und Thiazol, so sollte das Thiazol nicht adsorbiert werden, infolgedessen wohl *Mucor Ramannianus,* aber nicht *Phycomyces* auf dem Filtrat gedeihen; dagegen musste auch letzterer wachsen, wenn der Lösung noch Pyrimidin zugegeben wurde.

Abbildung 29.
Adsorption des hitzebehandelten Aneurins an Fullererde bei pH 4,6.

Test: *Phycomyces.*
1. Kontrolle, Aneurin erhitzt, Pyrimidinzugabe.
2. Fullererdefiltrat, Pyrimidinzugabe.
3. Fullererdefiltrat, ohne Pyrimidinzugabe.

Test: *Mucor Ramannianus.*
4. Kontrolle, Aneurin erhitzt.
5. Fullererdefiltrat.



Phycomyces bestätigte die Voraussagen weitgehend. Das Wachstum auf dem Filtrat war nur gut, wenn diesem Pyrimidin zugefügt wurde. Das heisst, dass das Fullererdefiltrat die andere Komponente des

Aneurins, das Thiazol enthielt. Allerdings wäre aus dem Verlauf der Kurven 1 und 2 in Abbildung 29 zu schliessen, dass die Umsetzung des Aneurins in Pyrimidin und Thiazol nicht quantitativ erfolgte. Die Abweichungen können aber z. T. durch die Fullererdebehandlung selbst verursacht worden sein. *Mucor Ramannianus* zeigt, weniger deutlich, dasselbe Verhalten.

Der Versuch bestätigt also nochmals, dass durch die Einwirkung der Hitze auf das Aneurin unter gewissen Bedingungen eine Aufspaltung desselben in Pyrimidin und Thiazol stattfindet. (Siehe auch Schopfer und Müller, 1938.)

C. Folgerungen.

Die Untersuchungen über die Veränderungen, welche das Aneurin in der Hitze erleidet, haben also ergeben, dass es unter noch nicht ganz bekannten Bedingungen in zwei Komponenten zerfällt, von denen die eine Pyrimidin-, die andere Thiazoleigenschaften aufweist. Die gebildeten Stoffe wirken auf *Phycomyces, Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* wachstumsfördernd. Sie entsprechen somit dem MP-Faktor. Ueber ihre Konstitution lässt sich an Hand der spezifischen Wirksamkeit der Substitutionsprodukte des 4-Methyl-5-hydroxyäthylthiazols und des 2-Methyl-4-amino-5-methylaminopyrimidins aussagen, dass gegenüber diesen hier nur eine Veränderung der Seitenkette in 5-Stellung des Pyrimidins in Frage kommen kann, eine solche aber eine gewisse Wahrscheinlichkeit besitzt. (Formel Seite 213.)

Eine Aufspaltung des Aneurins findet in den Extrakten zum Teil schon während der Extraktion des Materials statt, besonders wenn diese lange dauert oder bei hoher Temperatur stattfindet. Es ist nun verständlich, warum bei hoher Temperatur eingedickter Harn nur den MP-Faktor aufwies, während umgekehrt frischer Harn überhaupt keinen chloroformlöslichen Wachstumsfaktor besass. (Seite 205.) Bei quantitativen Untersuchungen müssen diese Tatsachen beachtet werden.

Zwischen *Phycomyces*- und Tiertest besteht nun auch eine klare Beziehung. Für den Tiertest, der nur das Aneurin anzeigt, muss sich eine starke und längere Erhitzung des Untersuchungsmaterials als aneurinschädigend anzeigen, während sie für den *Phycomyces*test, der auch die Aneurinkomponenten anzeigt, keinen Einfluss zu haben scheint. Dieser Gegensatz wird sich ebenfalls auswirken, wenn an Stelle des Tieres ein nur auf das ganze Aneurinmolekül ansprechender pflanzlicher Test verwendet wird.

Peters, Kinnersley, Orr-Ewing und Reader (1928) beobachteten, dass eine Hitzebehandlung eines Torulinpräparates von Peters in schwach alkalischer Lösung dessen Wirksamkeit auf das Tier zerstörte, aber die Wirksamkeit auf *Streptothrix corallinus* nicht

beeinflusste. Es wurde angenommen, dass der *Streptothrix*faktor nicht identisch sei mit Aneurin. Nach unsern Untersuchungen könnte es sich hier um die Wirkung des MP-Faktors handeln. Entweder würde *Streptothrix* auf Pyrimidin und Thiazol ansprechen; bei genügend schwacher Alkalibehandlung ist bei der Neutralisierung eine Rückbildung des Thiazols möglich (Grewe, 1937). Oder aber könnte es sich um einen Pyrimidinorganismus handeln, da das Pyrimidin durch Lauge nicht angegriffen wird.

X. Die Biosynthese des Aneurins durch Mucor Ramannianus.

A. Die Biosynthese des Pyrimidins durch Mucor Ramannianus.

Für die Beziehungen zwischen Thiazol und Aneurin im Stoffwechsel von *Mucor Ramannianus* sind zwei Möglichkeiten vorhanden : Entweder benötigt *Mucor Ramannianus* in seinen Lebensprozessen nur Thiazol und ist imstande, aus dem ihm zur Verfügung stehenden Aneurin, durch dessen Zerlegung in seine beiden Ringsysteme, das Thiazol zu gewinnen und das Pyrimidin als Stoffwechselprodukt abzuscheiden, oder aber benötigt er das ganze Aneurinmolekül, sei es als solches oder in seinen beiden Komponenten, und muss dann imstande sein, das Pyrimidin zu synthetisieren.

Es ist nun bekannt, dass das Aneurin als Pyrophosphorsäureester in den Kohlenstoffwechsel eingreift (Formel Seite 242; Lohmann und Schuster, 1937 a, b). Hills (1938) stellte fest, dass *Staphylococcus aureus* bei Gegenwart von Aneurin Brenztraubensäuresalze zu oxydieren vermag, während die Oxydation bei Aneurinmangel ausbleibt. Zu ähnlichen Ergebnissen war Krebs (1937) gekommen. Aneurin wirkt hier als Bestandteil der Cocarboxylase. Anderseits kommt Lipmann durch Versuche mit *Bacillus Delbrückii* zum Schluss, dass das Aneurin als Wasserstoffüberträger wirkt. Alle diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Aneurin für jedes Lebewesen unentbehrlich ist. Es muss deshalb angenommen werden, dass die Organismen, die kein Aneurin oder nicht das ganze Molekül benötigen, dasselbe selber ganz oder teilweise zu synthetisieren vermögen. Dagegen ist den das ganze Aneurinmolekül verlangenden Organismen dieses Synthesevermögen vollständig verlorengegangen (Schopfer, 1938 b).

Zur Prüfung dieser Frage wurde *Mucor Ramannianus* auf einer Nährlösung mit Thiazol gezüchtet und dann auf seinen Pyrimidingehalt mit Hilfe eines Pyrimidinpilzes, *Rhodotorula rubra,* und eines Pyrimidinthiazolpilzes, *Phycomyces Blakesleeanus,* geprüft. Von den Myzelien wurde in gewohnter Weise ein wässeriger Absud hergestellt und der Nährlösung für die Testobjekte zugesetzt. Untersucht wurde ebenfalls die Nährlösung, in der *Mucor Ramannianus* gewachsen war. Zu 20 ccm

alter Nährlösung wurden 5 ccm neue, viermal konzentrierte wirkstofffreie Nährlösung gegeben.

Wie Tabelle 45 zeigt, entwickelten sich *Rhodotorula rubra* wie *Phycomyces*, und zwar in Myzelabsud sowie in alter Nährlösung von *Mucor Ramannianus*. Damit war sichergestellt, dass *Mucor Ramannianus* Pyrimidin synthetisiert. Dieses findet sich einerseits in den Myzelien, diffundiert aber anderseits auch in die Nährlösung. Letzteres war nach Versuchen mit Bodenorganismen (siehe Seite 194) auch zu erwarten.

Mucor Ramannianus verhält sich somit gegengleich wie *Rhodotorula rubra*, die Pyrimidin verlangt, aber das Thiazol synthetisieren kann (Schopfer, 1937 b). Ein Auszug aus *Rhodotorula* wirkt denn auch fördernd auf *Mucor Ramannianus*. Beide Organismen brauchen in ihren Lebensprozessen Pyrimidin und Thiazol und unterscheiden sich von *Phycomyces Blakesleeanus* nur durch eine grössere Synthesefähigkeit.

Tabelle 45.

Je 10 Myzelien von *Mucor Ramannianus* wurden ausgewaschen, 10 Minuten in 10 ccm Wasser ausgekocht und die Absude der Nährlösung zugesetzt.

Testobjekt	Phycomyces				Rhodotorula rubra
Extraktmenge	Kontrolle	1 ccm	2 ccm	4 ccm	3 ccm
Myzelabsud		38	60	98	+++
» + Pyrimidin .		42	64	92	++++
Alte Nährlösung		18	?	35	+++
Kontrolle: Thiazolzusatz .	14				—
» kein Wirkstoff .	13				—

Für *Rhodotorula rubra*: ++++ sehr starkes, +++ starkes, — fehlendes Wachstum.

B. Künstliche Symbiose zwischen Mucor Ramannianus und Rhodotorula rubra.

Nach den bisherigen Ergebnissen bestand die Möglichkeit, *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* zusammen in wirkstofffreier Nährlösung zu züchten; denn wenn von jedem der beiden Partner der ihm mögliche Wachstumsfaktor synthetisiert und zum Teil in die Nährlösung abgegeben wurde, was durch die bisherigen Versuche erwiesen war, so stand auch jedem Partner die ihm fehlende Aneurinkomponente zur Verfügung. Vorerst war das Wachstum der beiden in wirkstofffreie Nährlösung zusammengeimpften Organismen äusserst schwach. Nach etwa acht Tagen aber begann die Entwicklung der beiden Partner rasch anzusteigen, und nach weiteren drei Wochen hatte *Mucor Ramannianus*, dessen Myzel von Hefen durchsetzt war und deshalb eine stark rote

Farbe, wie überhaupt ein etwas anderes Aussehen besass, ein maximales Gewicht von durchschnittlich 200 mg erreicht. Die Hefe hatte sich gleichzeitig als starker Belag auf dem Boden der Erlenmeyerkolben angesetzt. Auch sie zeigte eine optimale Entwicklung (Abbildung 30). *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* bildeten somit eine Symbiose.

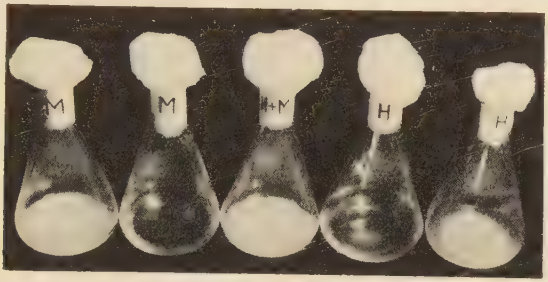


Abbildung 30.
Symbiose zwischen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra*. Links und rechts aussen: Mucor und Hefe getrennt auf aneurinhaltiger Nährlösung. Links und rechts von der Mitte: Dieselben auf wirkstofffreier Nährlösung. Mitte: Dieselben in Symbiose auf wirkstofffreier Nährlösung.

Nun wurde geprüft, ob durch eine sehr schwache Impfung des einen und eine starke des andern Partners das Gleichgewicht in der

Abbildung 31.
Mucor Ramannianus und *Rhodotorula rubra* in Symbiose. Die dunklen Ringe um das wachsende Gebilde bestehen hauptsächlich aus Hefezellen, währenddem sie in der Mitte vom *Mucor* überwachsen sind. Ausserhalb der dunklen Ringe verbreitet sich radial nach allen Seiten ein feines Geflecht der Hyphen des *Mucors*, dem entlang die Hefezellen sich weiterentwickeln können.

Symbiose verschoben werden könnte. Dies war nicht der Fall; alle Kulturen entwickelten sich ungefähr gleich rasch und zu den gleichen Endgewichten. Diese Stabilität ist an sich selbstverständlich und beweist die vollständige Abhängigkeit der beiden Organismen voneinander. Diese unbedingte Abhängigkeit zweier Organismen voneinander ist das Charakteristikum jeder echten Symbiose. Die Biosynthese des Pyri-

midins durch *Mucor Ramannianus* wie diejenige des Thiazols durch *Rhodotorula rubra* ist dadurch nochmals bewiesen.

C. Die Biosynthese des Aneurins aus Pyrimidin und Thiazol.

Die Methode zum Nachweis der Synthese war folgende: *Mucor Ramannianus* wurde auf Thiazol gezüchtet; dann wurde versucht, im Myzel des Pilzes wie auch in der Nährlösung Aneurin nachzuweisen. Dies wurde versucht einmal mit der Thiochrommethode von Jansen, dann indirekt mit dem Laugeverfahren. Die Thiochrommethode versagte in den Nährlösungen, weil andere Substanzen in ähnlicher Farbe fluoreszierten, wie das Thiochrom.

Myzelien, die auf Thiazol und ohne Wirkstoffe in Symbiose mit *Rhodotorula rubra* gezüchtet worden waren, wurden nach gründlichem Auswaschen mit Wasser kurz aufgekocht, eine Nacht stehengelassen und abfiltriert. Die Lösungen wurden nun je zur Hälfte einer einstündigen N 10-NaOH-Behandlung bei 120° unterworfen und mit HCl neutralisiert (pH 5). Alle Lösungen wurden mit *Phycomyces* geprüft (Tabelle 46).

Tabelle 46.

Wachstum von *Phycomyces* auf Absuden von *Mucor Ramannianus*.

Extrakte von Mucor Ramannianus auf		Myzeltrockengewichte					Thiochromnachweis
		2 ccm	5 ccm	10 ccm	15 ccm	20 ccm	
Aneurin	Kontrolle . . .	17	43	80	87	88	
	Alkalibehandlung .	7	17	23	28	26	
Thiazol	Kontrolle . . .	7	11	31	43	47	+ ?
	Alkalibehandlung .	12	13	18	23	25	
Symbiose	Kontrolle . . .	10	12	25	41	54	+ ?
	Alkalibehandlung .	11	17	26	20	18	

Durch die Laugebehandlung war die Wirksamkeit aller Lösungen auf *Phycomyces* herabgesetzt worden. Es mussten also Wachstumsfaktoren zerstört worden sein. Allerdings waren die Versuche nicht vollwertig, weil auch hemmende Stoffe das Wachstum von *Phycomyces* beeinflussten, was im Gewichtsabfall bei höhern Wirkstoffkonzentrationen zum Ausdruck kommt. Eigentümlicherweise wiesen aber umgekehrt die auf Aneurin gezüchteten Myzelien auch langerresistentere Faktoren auf.

Zur Anwendung des Thiochromnachweises mussten die Lösungen im Vakuum bei 60° auf $^1/_{10}$ eingeengt werden. Von der konzentrierten Lösung wurde dann je 2 ccm verwendet. Dabei ergab sich für die auf Aneurin gezüchteten Myzelien ein deutlicher Aneuringehalt von 0,4 γ bis 0,6 γ pro 2 ccm Untersuchungslösung. In den andern Kulturen war

ein Aneurinnachweis unsicher; der Wert lag unter 0,2 γ auf 2 ccm Untersuchungslösung.

Die entsprechenden Nährlösungen von *Mucor Ramannianus* bzw. der Symbiose wurden mit dem Laugeverfahren ebenfalls untersucht. Zu je 10 ccm doppelt konzentrierter Nährlösung wurde von der unveränderten und der alkalibehandelten alten Nährlösung in steigender Menge zugesetzt und mit Wasser auf gleiches Volumen ergänzt. Die Resultate stimmten mit denen der Absude überein (Tabelle 47).

Tabelle 47.

Wachstum von *Phycomyces* auf Nährlösung von *Mucor Ramannianus*.

Nährlösung mit		Myzeltrockengewichte				
		2 ccm	5 ccm	10 ccm	15 ccm	20 ccm
Aneurin	Kontrolle . . .	14	23	40	48	51
	Alkalibehandlung .	10	22	30	32	24
Thiazol	Kontrolle . . .	10	11	11	14	16
	Alkalibehandlung .	4	8	9	9	8
Symbiose	Kontrolle . . .	10	13	24	41	48
	Alkalibehandlung .	—	17	18	—	26

An Stelle des *Phycomyces*testes wurde nun *Mucor Ramannianus* selber als Test verwendet. Allerdings zeigte er dann nur das Vorhandensein von Thiazol an, was hier aber nicht von Bedeutung war. Der Absud von 15 auf Thiazol gewachsenen Myzelien von zusammen 2,24 g mit 120 ccm Wasser wurde zur Hälfte einer Alkalibehandlung unterzogen; dann wurden in gewohnter Weise Kulturen angesetzt.

Hier ist während der Laugebehandlung bloss rund ¼ der ursprünglichen Wirkstoffmenge erhalten geblieben. ¾ müssten also aus Aneurin bestanden haben (Tabelle 48).

Tabelle 48.

Wachstum von *Mucor Ramannianus* auf Absuden seines Myzels.

Absud in ccm	1	2	4	8	16
Kontrolle nicht alkalibehandelt	Sp	10	20	40	178
Versuch Alkalibehandlung .	0	0	Sp	5	22

Sp = Spur.

Ein fernerer Versuch sei noch angeführt, wo ausser der Zerstörung des Aneurins durch Lauge noch eine Adsorption desselben an Fullererde versucht wurde. Zur Untersuchung verwendet wurde ein Absud

aus Myzelien einer wirkstofffrei gezüchteten Symbiose mit *Rhodotorula rubra*. Als Testpilze kamen *Phycomyces* und *Mucor Ramannianus* zur Verwendung. Die Adsorption an Fullererde wurde geprüft an der Wirksamkeit der Filtrate.

Bei diesem Versuch (Tabelle 49), dem allerdings der Nachteil anhaftet, dass nicht ein Organismus für sich geprüft worden ist, traten wiederum dieselben Ergebnisse auf. Durch die Alkalibehandlung waren rund drei Viertel der Wachstumsfaktoren vernichtet worden, was im Versuch mit *Phycomyces* deutlich wird. Ebenfalls hat bei pH 4,6 eine Adsorption in ungefähr demselben Mass (siehe *Mucor Ramannianus)* stattgefunden. *Phycomyces* weist auf dem Filtrat ein schlechteres Wachstum auf, als auf der laugebehandelten Lösung. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, dass das Pyrimidin ebenfalls adsorbiert werden sollte. (Eigentlich hätte hier überhaupt kein Wachstum von *Phycomyces* auftreten dürfen.)

Tabelle 49.

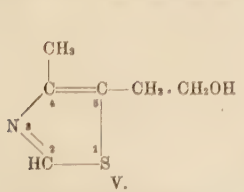
Eigenschaften der durch die Ergebnisse synthetisierten Wachstumsfaktoren.

Menge der Lösung	½ ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm	8 ccm	16 ccm
entspricht mg Myzelabsud	10,4	20,8	41.7	83,5	167	334
Phycomyces:						
Kontrolle	11	12	30	33	44	94
Nach Alkalibehandlung	7	10	16	18	20	30
Fullererdefiltrat	Sp	Sp	11	10	16	24
Mucor Ramannianus:						
Kontrolle	1	4	6	10	18	38
Nach Alkalibehandlung	sehr schwaches Wachstum				9	11
Fullererdefiltrat	sehr schwaches Wachstum				7	10

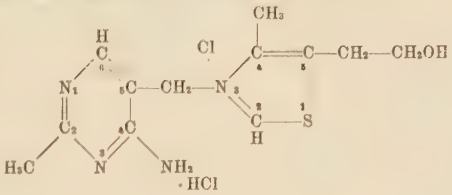
Damit ist die Aneurinsynthese doch sehr wahrscheinlich gemacht. Allerdings konnte sie nur indirekt nachgewiesen werden. Die Thiochrombestimmungsmethode hatte keine einwandfrei positiven Resultate ergeben. Eigentümlicherweise waren ähnliche Untersuchungen bei *Phycomyces* mit dem Tiertest negativ verlaufen. Das machte unsere Resultate vorerst etwas unsicher. Doch konnte jetzt mit dem *Phythophthora*-test von Schopfer bei *Phycomyces* und bei *Mucor Ramannianus* Aneurin nachgewiesen werden (Schopfer, 1939). Es bleibt vorläufig die Frage offen, ob es sich dabei um ein auf das Tier unwirksames Aneurinhomolog handeln könnte. Allerdings lässt der *Phycomyces*test wenig solcher Möglichkeiten offen. In Frage käme auch die Cocarboxylase, auf die die pflanzlichen Aneurinteste positiv, das Tier aber negativ reagiert.

D. Die konstitutionsspezifische Wirksamkeit des Thiazols.

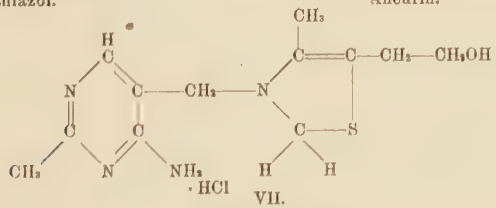
Die Wirkungsweise des Aneurins beruht wohl in allen Lebewesen auf denselben chemischen Reaktionsgruppen. Gleichwohl reagieren die aneurinheterotrophen Organismen nicht einheitlich auf Substitutionen im Aneurin oder seinen Komponenten. Da *Mucor Ramannianus* nur Thiazol benötigt, so beschränkt sich hier das Problem auf sein Verhalten gegenüber Thiazolderivaten und Thiazoloniumverbindungen (mit 5-wertigem N-Atom). Zieht man in Betracht, dass das Thiazol wahrscheinlich mit Pyrimidin zu Aneurin und weiter zu der Cocarboxylase (L o h m a n n und S c h u s t e r, 1937 a, b) aufgebaut wird, so erhalten die Substitutionen in 3-Stellung (Bindung des Pyrimidins) und in 5-Stellung (Bindung der Phosphorsäure) besondere Bedeutung. Für eine Wirkung des Aneurins als Dehydrase nach L i p m a n n (1937 a, b) ist das H-Atom in 2-Stellung wichtig (Uebergang in Dihydroaneurin, siehe Formel VII). Eine Substitution dieser reaktionsbereiten Gruppe hebt die Wirkung des Aneurins auf alle bisher untersuchten Organismen auf (S c h o p f e r, 1939). Ihre Wichtigkeit für die chemischen Nachweismethoden des Aneurins ist früher genannt worden (Seite 225).



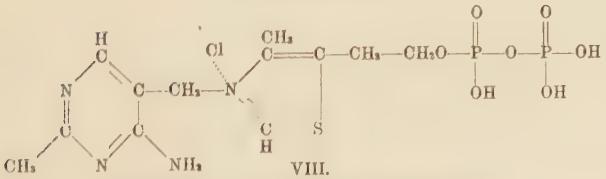
V.
4-Methyl-5-hydroxyäthyl-thiazol.



VI.
Aneurin.



VII.
Dihydroaneurin.



VIII.
Cocarboxylase (Aneurinpyrophosphorsäureester).

1. Thiazoloniumverbindungen.

Unter dieser Bezeichnung verstehen wir alle Verbindungen des Thiazols, in denen das N-Atom (3) fünfwertig ist. Tabelle 50 gibt eine Zusammenstellung der geprüften Substanzen.

Tabelle 50.

Wachstumswirkung verschiedener Thiazoloniumverbindungen auf *Mucor Ramannianus*.

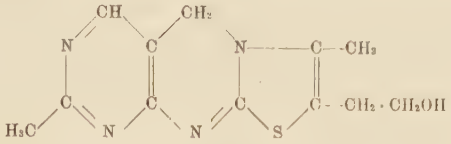
	Myzelgewichte von Mucor Ramannianus bei Zugabe von						
	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
1. 3-Benzyl-4-methyl-5-β-hydroxyäthylthiazol	kein Wachstum						5
2. 3-[4 (5)-Methylimidazol]-4-methyl-5-β-oxyäthylthiazolchlorür	0	18	35	73	68	103	107
3. Aneurin	0	11	22	36	59	70	—
4. Aneurin mit Aethylgruppe in 2-Stellung des Pyrimidins	0	8	17	32	82	112	—
5. Aneurin mit OH-Gruppe in Stellung 4 des Pyrimidins .	0	9	21	38	77	104	—

Ausser auf der ersten gedieh *Mucor Ramannianus* mit allen Substanzen. Dagegen können Organismen, die beide Aneurinkomponenten benötigen, ausser der ersten auch die zweite und die fünfte Verbindung nicht ausnützen, weil in 1 und 2 das Pyrimidin fehlt, in Verbindung 5 die wichtige NH_2-Gruppe in 4-Stellung des Pyrimidins durch eine OH-Gruppe ersetzt ist. Die einfachste Annahme ist die, dass *Mucor Ramannianus* imstande ist, aus den Verbindungen das Thiazol abzuspalten und zu verwenden. Diese Hydrolysefähigkeit ist für das Aneurin schon früher (Seite 225) festgestellt worden. Auch stimmt eine solche Annahme mit den Befunden bei *Phycomyces* und andern PT-Organismen überein, die diese Verbindungen ebenfalls als Thiazolquellen auszunützen vermögen, wenn ihnen noch Pyrimidin zur Verfügung steht (Schopfer, 1939). Dabei bleibt unverständlich, warum das Benzylthiazol unwirksam blieb, das von *Phycomyces* wie andere Verbindungen ausgenützt wird.

Mit dem «Aethylaneurin» (Tabelle 50) wurden regelmässig höhere Gewichte erzielt als mit gewöhnlichem Aneurin. Bei einer Hydrolyse der Verbindungen und einer nachfolgenden Resynthese sollten übereinstimmende Gewichte auftreten. So muss doch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass gewisse Wachstumsfaktoren direkt assimiliert werden, ohne dass eine Hydrolyse erfolgt. Wieweit ein Umbau der veränderten Moleküle nötig ist, lässt sich nicht sagen. Dass nicht unbedingt ein Umbau in Aneurin notwendig ist, haben Bonner und Buchmann an Pisum gezeigt. Aneurinanaloge wurden von dieser Pflanze verwertet, aber nicht in auf *Phycomyces* wirksame Faktoren umgesetzt (Schopfer, 1939). So können wir sagen, dass eine Hydrolyse

der Thiazoloniumverbindungen durch *Mucor Ramannianus* sicher stattfinden kann; ob sie aber auch durchgeführt wird, wenn direkt verwendbares Aneurin oder Aneurinanaloge vorliegen, bleibt unentschieden.

Thiochrom kann von *Mucor Ramannianus* nicht ausgenützt werden. Für *Phycomyces* und *Rhodotorula rubra* kann es als Pyrimidinquelle dienen. Ein gleiches Hydrolysevermögen bringt aber *Mucor Ramannianus* keinen Vorteil.



IX.
Thiochrom.

2. Thiazolderivate und im Thiazol veränderte Aneurinanaloge.

Versuche mit in 2-Stellung substituiertem Thiazol konnten nicht gemacht werden. Die folgenden Untersuchungen bezogen sich nur auf die Substitutionen in 5-Stellung des Thiazols. Zur Prüfung gelangten :

Substanz	Wachstum von Mucor Ramannianus
4-Methylthiazol	0
4-5-Dimethylthiazol	0
4-Methyl-2-mercaptothiazol	0
Aneurin mit Ersatz der Hydroxyäthylgruppe in 5-Stellung des Thiazols durch eine β-Hydroxypropylgruppe . .	0
γ-Hydroxypropylgruppe . .	0

Diese Versuche ergeben kein Wachstum beim Ersatz der Hydroxyäthylgruppe in der 5-Stellung durch ein H-Atom, durch eine Methylgruppe und durch das Hydroxypropyl. Dieselben Ergebnisse zeitigte *Phycomyces* (Schopfer, 1939). Dieser verlangt ausser der endständigen, reaktionsfähigen Gruppe (OH, Cl oder $-O \cdot CO \cdot C_2H_5$) die Beibehaltung der Länge der Seitenkette ($-CH_2-CH_2-$). Andere Organismen, die Flagellaten, *Staphylococcus*, die *Pisum*wurzel u. a. sind weniger spezifisch; sie reagieren auf den Ersatz der Hydroxyäthylgruppe durch eine Hydroxypropylgruppe positiv. Ohne dass weitere Substitutionsprodukte geprüft werden konnten, lässt sich doch vermuten, dass das Verhalten von *Mucor Ramannianus* demjenigen von *Phycomyces* ähnlich sein wird. Die Konstitutionsspezifität des Thiazols erscheint somit recht ausgeprägt, vorausgesetzt, dass mit Mengen, die der optimalen Aneurindosis entsprechen, gearbeitet wird.

XI. Die ökologische Bedeutung der Wachstumsfaktoren für Mucor Ramannianus.

A. Wachstumsfaktoren und Symbiosen.

Mit der künstlichen Symbiose zwischen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* konnte gezeigt werden, wie die oft beim Zusammenleben zweier Mikroorganismen beobachtete Stimulation auf der Wirkung von Wachstumsfaktoren beruhen kann. Im erwähnten Fall sind diese genau bekannt. Eine gleiche Symbiose kann auch zwischen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula flava* hergestellt werden, allerdings ist hier das Wachstum weniger gut. *Rhodotorula flava* reagiert wie *R. rubra* auf Pyrimidin (Schopfer, 1937).

Wahrscheinlich beruht das Wachstum einiger der in Tabelle 51 genannten Mischkulturen ebenso auf einer gegenseitigen Förderung. Es ist bekannt, dass *Saccharomyces cerevisiae* Biossubstanzen verlangt — auf unserer aneurinhaltigen synthetischen Nährlösung fand kein Wachstum statt — aber Aneurin selber synthetisieren kann. Es ist anzunehmen, dass in der Mischkultur von *Mucor Ramannianus* Biotin, von *Saccharomyces cerevisiae* Aneurin abgegeben worden ist.

Tabelle 51.

Wachstum von *Mucor Ramannianus* in Gemeinschaft mit andern Pilzen auf synthetischer Nährlösung.

Infektionspilz	Entwicklung von Mucor Ramannianus
Aspergillus parasiticus	gut (im Infektionsmyzel)
» albus	null (auch Aspergillus)
» flavus	gut (im Infektionsmyzel)
Endomyces Magnusii	null (auch Endomyces)
Schwanniomyces occidentalis	sehr gut
Saccharomyces cerevisiae	» »
» ellipsoides	» »
Rhodotorula rubra	» »
» flava	schwach
Penicillium glaucum	von Penicillium überwuchert

Hier sei auch die künstliche Symbiose zwischen *Nematospora gossypii* und *Polyporus adustus* von Kögl und Fries erwähnt. *Nematospora* synthetisiert Aneurin und verlangt Biotin, *Polyporus* dagegen synthetisiert Biotin und benötigt Aneurin.

Natürlich kann ein Wachstum beider Organismen auch dann zustande kommen, wenn der eine von ihnen auxoautotroph ist. Der heterotrophe Partner bezieht dann nur ohne zu liefern. Damit haben wir den Fall von einseitiger Förderung, im Extremfall vielleicht einen Para-

sitismus. Dies ist der Fall bei *Penicillium* (hier hat dieses allerdings recht rasch den *Mucor* überwuchert) und bei den beiden *Aspergillus parasiticus* und *A. flavus*. Für die übrigen Mischkulturen sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Anderseits müssen für ein Zusammenleben in Mischkulturen wohl mehrere günstige Umstände zusammentreffen. Das zeigt sich darin, dass die Symbiose zwischen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula flava*, wo in bezug auf die Aneurinfrage gleiche Verhältnisse vorliegen wie bei *R. rubra*, das Wachstum schwach ist. Ferner zeigt es sich bei *Penicillium glaucum*, wo *Mucor Ramannianus* nach anfänglichem Wachstum bald vollständig verdrängt wird. Selten werden dann die Möglichkeiten eines Zusammenlebens, wenn das künstliche Milieu fehlt. Damit stellt sich nun auch die Frage nach der Bedeutung der Wachstumsfaktoren für die natürlichen Symbiosen.

In der Natur werden die künstlichen Symbiosen kaum jemals zustande kommen. Im Fall von *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* sind beide Organismen (wie überhaupt der grösste Teil der Auxoheterotrophen) auf eine organische Kohlenstoffquelle angewiesen. Alle bisherigen Versuche haben aber gezeigt, dass überall dort, wo organische Substanzen in der Natur vorhanden sind, auch das Aneurin oder seine Komponenten vorkommen. Eine Symbiose hätte somit kaum einen Vorteil.

Hingegen darf die Rolle der Wachstumsfaktoren für das Zusammenleben der Organismen nicht ausser acht gelassen werden. Sicher wird manche Symbiose und wohl auch mancher Parasitismus, die heute noch ungeklärt sind, von Wachstumsfaktoren mitbedingt. Bekannt ist vor allem die Orchideenmycorhiza. Die *Vandeen* beziehen z. B. während ihres heterotrophen Entwicklungsstadiums vom Pilz Wachstumsfaktoren, währenddem sie ihm Nährstoffe liefern (Schaffstein, 1938).

Nun ist aber auch der Fall möglich, dass eine autotrophe Pflanze ein für bestimmte Wachstumsfaktoren gehemmtes Synthesevermögen besitzt, wie der Fall von *Camellia* nach Bonner und Greene (Schopfer, 1939) zeigt. Diese Pflanze ist auf einen Aneurinzuschuss von aussen angewiesen. Hier würde eine Symbiose zwischen den Wurzeln der höhern Pflanze mit einem auxoautotrophen Mikroorganismus für beide Partner Vorteile bringen können. Die höhere Pflanze bezöge Aneurin aus dem Mikroorganismus und dieser fände an ihren Wurzeln Kohlehydrate.

Bonner (1938) hat bei *Pisum* festgestellt, dass die isolierte Wurzel wie *Phycomyces* Pyrimidin und Thiazol benötigt. Diese Stoffe müssen ihr also aus dem Spross zugeführt werden. Möglicherweise beziehen sie aber solche auch in der Natur von aussen, d. h. von andern Organismen. Anderseits ist durch Robbins nachgewiesen worden, dass die Tomatenwurzel, wie *Mucor Ramannianus*, Pyrimidin syntheti-

siert und nur Thiazol aus dem Spross bezieht. Hier wäre nun der Fall denkbar, dass bei einer Pflanze von diesem Typus, wo die Synthese der beiden Aneurinkomponenten nicht am gleichen Ort stattfindet, die Bildung der einen oder andern Substanz — erbbedingt — erschwert wäre. Die ganze Pflanze näherte sich dann mehr oder weniger dem *Mucor Ramannianus-* oder dem *Rhodotorula rubra*-Typus. Dann wäre eine Symbiose mit einem Pyrimidin- bzw. Thiazolpilz nicht ausgeschlossen. Vielleicht dürfte das Zusammenleben von *Mucor Ramannianus* mit jungen Kiefern auch unter diesem Gesichtspunkt untersucht werden.

Der weitaus häufigste Fall wird allerdings der sein, dass der mehr oder weniger auxoheterotrophe Mikroorganismus als Parasit oder Saprophyt der auxoautotrophen Pflanze auftritt.

B. Die Bedeutung des Erdbodens für einen Austausch der Wachstumsfaktoren zwischen den Pflanzen.

Es ist gezeigt worden, dass auch der Erdboden auf *Mucor Ramannianus* wirkende Wachstumsfaktoren enthält. Für die Anreicherung an solchen kommen folgende Quellen in Betracht:

a) Aus den Wurzeln der höhern Pflanzen diffundieren Wachstumsfaktoren (nebst andern Substanzen) in den Boden (s. Seite 186).

b) Mit den abfallenden Samen und Blättern und ihrer Zersetzung auf oder in der Erde werden dieser direkt Wachstumsfaktoren zugeführt. In faulendem Laub konnten beträchtliche Mengen von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (s. Seite 196). Dabei bleibt allerdings unentschieden, ob es die ursprünglich in den Blättern vorhandenen oder im Zersetzungsprozess gebildeten Wirkstoffe sind.

c) Die ganz oder teilweise auxoautotrophen Mikrolebewesen des Bodens geben Wachstumsfaktoren in ihre Umgebung ab. Mit Bakterien und Pilzen des Waldbodens wird eine Nährlösung stark an Wachstumsfaktoren angereichert (Seite 194).

Somit müssen in bezug auf die Wachstumsfaktoren auch Beziehungen bestehen vom Lebewesen zum Boden und zum andern Lebewesen. Hier erhebt sich nun die Frage, welche Rolle der Erdboden dabei spielt.

Die Feststellung, dass der Wirkstoffgehalt des Bodens mit der Tiefe rasch abnimmt, ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die Zufuhr der Wachstumsfaktoren hauptsächlich von den obern Erdschichten her erfolgen muss. Dass tiefere Schichten nur einen sehr geringen Wirkstoffgehalt aufweisen, kann aber seinen Grund auch darin haben, dass hier Zersetzungen desselben stattfinden, oder dass durch das Sickerwasser eine Auslaugung und Abführung derselben vor sich geht. Anderseits besteht die Möglichkeit, dass die Wachstumsfaktoren adsorptiv an ihrem Ursprungsort zurückgehalten werden.

Der nachfolgende Versuch sollte darüber einen Anhaltspunkt geben; es wurde das Adsorptionsvermögen einer Erdprobe für Aneurin untersucht. Die Versuchsanordnung gibt das nachfolgende Schema:

100 ccm Aneurinlösung à 0,4 γ/ccm (total 40 γ)		Wasser rein
I.	II.	III.
50 ccm zu 50 g trockener Walderde gegeben und 24 Std. stehen gelassen (Kühlschrank). Dann Flüssigkeit abfiltriert. Es werden weniger als 50 ccm zurückgewonnen.	Aneurinlösung Kontrolle	Behandlung genau wie I, statt mit Aneurinlösung, so hier mit Wasser. Filtrat. Dazu Aneurinlösung.
Lösung unverändert verwendet zu Kulturen.	Kontrollkulturen	Kontrolle: Wirkung der Erdwirkstoffe + Aneurin.

Die Resultate sind in Tabelle 52 zusammengestellt.

Würde die Erde ohne Einfluss auf das Aneurin gewesen sein, so müsste das Erdfiltrat pro 1 ccm noch den gleichen Aneurinwert aufweisen wie die Kontrollen II und III. Ein Zusatz von 4 ccm Filtrat, das einem Aneurinwert von 1,6 γ entsprach, hatte aber nur die Wirkung von etwa 0,05 γ, also von $^1/_{32}$. Durch die Kontrolle III ist ausgeschlossen, dass das Resultat auf einer Hemmung durch Beistoffe beruht. Ferner ist durch den erneuten Auszug mit verdünntem Alkohol erwiesen, dass auch keine Zerstörung des Aneurins stattgefunden hatte. Es muss von der Erde adsorbiert worden sein. Handelt es sich im Boden um Aneurin, so bleibt dasselbe wohl adsorptiv in den Entstehungsschichten haften. Weitere Versuche hierüber sind noch nicht gemacht worden.

Tabelle 52.

Adsorption des Aneurins durch Erde.

Zusatz zur Nährlösung	Ursprünglicher Aneuringehalt		
	0,4 γ	0,8 γ	1,6 γ
Erdfiltrat der Aneurinlösung (I)	2,5	6,5	14,5
Kontrolle Aneurin rein (II)	130	162	125
Kontrolle Aneurin + Wasserauszug aus Erde (III)	145	120	140
Erneuter Auszug mit 50 ccm verdünntem Alkohol (IV)	8	17	23

Die Bindung der Wachstumsfaktoren an die Erde wird aber noch durch eine weitere Beobachtung wahrscheinlich gemacht. Walderde von einer Stelle am Niesen in 1200 m Höhe, wo durch die Unmöglichkeit des Holzschlagens völlig natürliche Verhältnisse bestehen, aus 20 cm Tiefe, schwarz, vom pH 7,2 wurde in der Luft getrocknet und dann mehrmals extrahiert. Die auf $^1/_{10}$ des Erdgewichtes eingeengten Lösungen wurden auf *Mucor Ramannianus* geprüft (Tabelle 53).

Tabelle 53.

Wirkung von vier Auszügen aus 250 g Erde.

Lösung in ccm	1	2,5	5	10
entspricht Erde in g	10	25	50	100
1. Auszug: 1 Stunde kochend . . .	55	221	239	—
2. » 12 Stunden kalt	Wachstum vorhanden			
3. » 1 Stunde kochend . . .	—	246	260	215
4. » 1 » mit heissem, verdünntem Alkohol	—	136	176	215

Durch diese vier Extraktionen war noch keine Erschöpfung des Wirkstoffgehalts der Erde eingetreten. Es muss demnach ein bedeutend grösserer Gehalt an Wachstumsfaktoren angenommen werden, als ein einmaliger Auszug vermuten liesse. Die Nichtfreigabe der Wachstumsfaktoren während einer Extraktion muss aber doch auf einer Adsorption beruhen.

Die Frage, ob die Wachstumsfaktoren im Boden einer Zersetzung anheimfallen und dadurch für die Pflanzenwelt verlorengehen, ist nicht untersucht worden. Doch weisen Dekokte von Torf, die ein positives Wachstum von *Mucor Ramannianus* und *Phycomyces* auslösten, eher darauf hin, dass die Wachstumsfaktoren grosse Zeitspannen überdauern können.

Aus diesen Tatsachen geht hervor, dass zwischen den Lebewesen über das Zwischenglied des Bodens wohl ein Austausch von Wachstumsfaktoren in grossem Ausmass stattfindet. Es ist ein Austausch vom auxoautotrophen zum auxoheterotrophen Organismus in bezug auf jeden einzelnen Faktor. Berücksichtigen wir aber die Mannigfaltigkeit der Reaktionsgrade in bezug auf die verschiedenen Wachstumsfaktoren, so gelangen wir zum Schluss, dass die Beziehungen von Lebewesen zu Lebewesen hier ausserordentlich vielgestaltig sein werden (Schopfer, 1930).

In diesem Zusammenhang gewinnen die künstlichen Symbiosen auch eine andere Bedeutung. Nochmals zurückkommend auf die Symbiose zwischen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* sei die Frage

gestellt, wie eng das Zusammenleben hier sei. Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten. Entweder besitzen die Partner die Fähigkeit, die gegenseitig benötigten Stoffe einander aktiv zu entnehmen, also gewissermassen gegenseitig als Parasiten aufzutreten, oder aber können sie nur — in bezug auf die Symbiose passiv — diejenigen Stoffe aufnehmen, die vom Partner in die Nährlösung diffundiert sind. Im letzteren Fall, der für unsere Symbiose wohl hauptsächlich zutrifft, steht somit zwischen den Partnern als Zwischenglied die Nährlösung. Sie ersetzt im Versuch die Erde. Der Versuch ist also eine Demonstration des Stoffaustausches, wie er in der Natur stattfinden wird.

Damit stellt sich das Problem der Verbreitung von *Mucor Ramannianus* von neuem. Für das fast ausschliessliche Vorkommen im Waldboden besteht von Seite der Versorgung mit Wachstumsfaktoren kein Grund. Es müssen vielmehr andere Faktoren die Verbreitung bestimmen. Die Wasserstoffionenkonzentration wird eine Rolle als begrenzender Faktor spielen. Vor allem aber wird der Pilz doch wohl durch das reichlichere Vorhandensein organischer Kohlenstoffquellen an den Wald und an die Nähe der Wurzeln gebunden sein (Tabelle 54).

Tabelle 54.

Erde als Kohlenstoffquelle.

Mucor Ramannianus auf Erddekokt	mit Glucose	ohne Glucose
aus 76 g Erde, 11—15 cm Tiefe	20 mg	0
» 50 g » 6— 8 cm »	26 mg	7,5 mg
» 10 g » 1— 3 cm »	87 mg	2,5 mg

Ferner konnte auf Extrakten aus einigen bestimmten Pflanzenmaterialien, wie *Pinus*samen, Weizenkeim, Reiskleie, Hefe usw., ein Wachstum von *Mucor Ramannianus* erzielt werden, wie es mit synthetischen Substanzen kaum möglich war. Die Ursache kann darin liegen, dass mit den Extrakten der Nährlösung noch fördernde Nährstoffe zugeführt wurden. Es könnte sich aber auch um einen weitern Wachstumsfaktor handeln, dessen Synthese *Mucor Ramannianus* wohl noch bis zu einem gewissen Grad durchführen kann, dessen Zugabe zur Nährlösung aber, ähnlich wie bei *Absidia ramosa* u. a. das Aneurin (Schopfer, 1937 b), eine Förderung bedeutet. Auch hierin könnte erneut das Problem seines spezifischen Vorkommens zu suchen sein.

XII. Zusammenfassung.

Mucor Ramannianus gedeiht auf synthetischer, wirkstofffreier Nährlösung nicht. Das Wachstum ist aber optimal, wenn der Nährlösung pro 1 Liter 60 γ Aneurin oder 30 γ Thiazol beigefügt werden.

Als Kohlenstoffquellen kann *Mucor Ramannianus* alle Kohlehydrate ausser der Cellulose, die höheren Alkohole, die pflanzlichen Membranstoffe Lichenin und Pektin verwerten.

Als Stickstoffquellen können die organischen Verbindungen von den Eiweissen bis zu den Aminosäuren und die anorganischen Verbindungen wie Nitrate, Ammoniumverbindungen, Ammoniak ausgenützt werden.

Für ein gutes Wachstum muss die H-Ionenkonzentration zwischen pH 3 und 6 liegen. Der Pilz säuert seine Umgebung selber stark an.

Licht, Temperatur, Kohlensäuregehalt der Luft haben innerhalb normaler Grenzen keinen Einfluss.

Die Verbreitung der auf *Mucor Ramannianus* wirksamen Wirkstoffe ist allgemein. Alle untersuchten Pflanzen und Pflanzenteile hatten eine wachstumsfördernde Wirkung auf *Mucor Ramannianus*. Besonders intensiv wirkten Auszüge aus Reiskleie, Weizenkeim, Weizenkorn, *Pinus*samen usw., also Stoffe, die aneurinreich sind. Eine Wirksamkeit auf *Mucor Ramannianus* hatten aber auch Nährlösungen, auf denen wirkstoffautotrophe Mikroorganismen (Pilze, Bakterien) gewachsen waren. Wachstumsfördernd wirkten ferner Harn sowie Auszüge aus Erde.

Die wirksamen Substanzen können durch die pflanzlichen Membranen diffundieren. Der Gehalt des Bodens an Wirkstoffen rührt wohl zum Teil davon her; Wurzeln, aber auch auf den Boden fallende Pflanzenteile werden von ihrem Wirkstoff an den Boden verlieren. Aber auch die wirkstoffautotrophen Bodenorganismen werden zur Anreicherung beitragen.

Im Boden ist eine Parallelität des Stickstoffgehaltes mit der Menge der Wirkstoffe festzustellen. Vielleicht unterliegen die Wirkstoffe einer adsorptiven Bindung an den Humus, wie dies für das Aneurin festgestellt werden konnte.

Es scheint, dass die Wachstumsfaktoren bedeutend verbreiteter und in grösserer Menge vorhanden sind, als das Vorkommen von *Mucor Ramannianus* schliessen liesse. Für *Mucor Ramannianus* spielt aber nicht nur das Auffinden einer genügenden Menge von Wirkstoffen, sondern ausserdem die Wasserstoffionenkonzentration des Bodens und vor allem der Mangel an genügenden Kohlenstoffquellen eine die Verbreitung beschränkende Rolle.

Die Eigenschaften der Wachstumsfaktoren verschiedener Herkunft stimmten allgemein miteinander überein. Charakteristisch sind folgende: Adsorbierbarkeit an Tierkohle, nichtfällbar mit Bleiacetat, nichtzerstörbar durch mehrstündiges Erhitzen auf 130°. Löslich in Alkohol, Methanol, Aceton, Pyridin, Benzol, Chloroform, Wasser. Schlecht löslich in Aether. Zerstörbar durch Veraschung. Eine Adsorption an Fullererde,

eine Fällung mit Phosphorwolframsäure verlaufen nicht quantitativ, ebenso ist keine vollständige Zerstörung durch Hitzebehandlung in alkalischem Milieu möglich.

Charakteristische Eigenschaften für die synthetischen Wachstumsfaktoren sind :

a) Aneurin : Unlöslichkeit in Chloroform, adsorbierbar an Fullererde bei pH 4,6. Zerstörbar durch alkalische Erhitzung. Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure.

b) Thiazol : Löslichkeit in Chloroform, Nichtadsorbierbarkeit an Fullererde bei pH 4,6. Nichtzerstörbarkeit durch Alkali.

c) Pyrimidin : Schlechte Löslichkeit in Chloroform. Adsorbierbar an Fullererde. Alkaliresistenz.

Die Eigenschaften der natürlichen Extrakte sprechen dafür, dass ihre Wirksamkeit auf einem Gemisch Aneurin, Pyrimidin, Thiazol beruht. Der M-Faktor wäre somit zum Teil den Komponenten Pyrimidin und Thiazol gleichzusetzen. Für *Mucor Ramannianus* würde er mit dem Thiazol identisch sein. Doch müssen auch noch bisher nicht bestimmte Faktoren eine Rolle spielen.

Die oben angeführten Eigenschaften erlauben auch eine Trennung der Wirkungen der verschiedenen Komponenten.

Unter noch nicht völlig abgeklärten Bedingungen wird das synthetische Aneurin in wässeriger Lösung in der Hitze in seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol zerlegt. Die Spaltung in dieser Weise ist nicht quantitativ; ein Teil der Wirksamkeit geht meistens verloren.

In den Extrakten scheint die Spaltung des Aneurins in der Hitze quantitativ zu verlaufen. Dadurch ist das Auseinanderweichen von Tier- und *Phycomyces*test nach einer Hitzebehandlung aneurinhaltiger Substanzen zu erklären. Durch das dargestellte Laugeverfahren wird es möglich, auch mit dem *Phycomyces*test den Aneuringehalt einer Substanz zu bestimmen. Zugleich kann damit aber auch der Gehalt an Pyrimidin und Thiazol ermittelt werden.

Mucor Ramannianus ist imstande, die eine Komponente des Aneurins, das Pyrimidin selber zu synthetisieren. Er benötigt diese in seinem Stoffwechsel.

Anderseits vermag *Rhodotorula rubra*, die mit dem Pyrimidin in der Nährlösung auskommt, das Thiazol selbst zu bilden.

Impft man *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* zusammen in wirkstofffreie Nährlösung, so bildet jeder Partner die Komponente, die der andere benötigt. Sie bilden eine künstliche Symbiose.

Die Aneurinsynthese durch *Mucor Ramannianus* konnte nicht streng bewiesen werden; sie ist aber wahrscheinlich. Die Bestimmungen müssten mit sehr grossen Mengen durchgeführt werden, ferner müsste eine Reinigung der Substanzen erfolgen.

Die konstitutionsspezifische Wirksamkeit der Thiazole :

Nicht verändert werden dürfen die Aethylgruppe in 5. Eine längere oder kürzere C-Kette hebt die vitaminische Wirkung auf.

Eine Verbindung des Thiazols am N-Atom über eine CH_2-Gruppe mit einem nichttoxischen Stoff verändert die Wirkung nicht.

Aneurinanaloge : Eine Veränderung des Pyrimidinkerns hat keine Wirkung auf *Mucor Ramannianus*. Eine Veränderung der Oxyäthylgruppe am Thiazol hebt die Wirkung auf.

Thiochrom kann von *Mucor Ramannianus* nicht verwertet werden.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Bern in der Zeit vom März 1936 bis zum Dezember 1938 ausgeführt. Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. H. Schopfer, auf dessen Veranlassung die Arbeit unternommen wurde, für die Unterstützung, die er mir jederzeit gewährte, und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Ferner danke ich der Firma Hoffmann-La Roche für das Aneurin und dessen Komponenten und Substitutionsprodukte, sowie der «Ciba» für das Orypan. Auch Herrn Dr. Grewe sei für die Uebermittlung eines Aneurinsubstitutionsproduktes der beste Dank ausgesprochen.

Literatur.

Abderhalden, E.: Die physiologischen Funktionen von Vitamin B_1 (Aneurin. Thiamin). Verhandl. deutsch. Ges. f. innere Med. 50. Kongress, 319 (1938).
E. und R.: Die Heilung der B_1-Avitaminose bei der Taube durch Zufuhr der Thiazol und Pyrimidinkomponente des Aneurins. Pflügers Arch. **240,** 746 (1938).

Andersag H. und K. Westphal: Ueber die Synthese des antineuritischen Vitamins. Ber. dtsch. chem. Ges. **70,** 2035 (1937).

Asthana, R. P. and L. E. Hawker: The influence of certain fungi on the sporulation of Melanospora destruens Shear and of some other Ascomyces. Ann. Bot. **50,** 325 (1936).

Barger, G., F. Bergel and A. R. Todd: Crystalline fluorescent dehydrogenation products from vitamin B_1. Nature (Lond.) **136,** 259 (1935).
F. Bergel and A. R. Todd: Ueber das Thiochrom aus Vitamin B_1 (Antineurin). Ber. deutsch. chem. Ges. **68,** 2257 (1935).

Blaringhem, L.: Symbiose et Parasitisme. L'œuvre de Noël Bernard. Masson, Paris. 1937.

Bomskov, Ch.: Methodik der Vitaminforschung. Thieme, Leipzig 1935.

Bonner, J. and E. R. Buchmann: Syntheses carried out in vivo by isolated pea roots. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **24,** 431 (1938).

Bargetz, H.: Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr. Ber. deutsch. bot. Ges. **52,** 384 (1934).

Dagys, J.: Die Hefewuchsstoffe in Knospen und Blättern. Protoplasma **26,** 20 (1936).

Fries, N.: Ueber die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symbolae Botanicae Upsalienses III, 2. (1938).
Funk, C.: Die Vitamine. München, J. F. Bergmann 1924.
Grewe, R.: Das Aneurin. Erg. Physiol. **39**, 252 (1937).
Hagem, O.: Untersuchungen über norwegische Mucorineen I. Christian. Videnskabsselsk. Skr. (1908).
— Untersuchungen über norwegische Mucorineen II. Christian. Videnskabsselsk. Skr. (1910).
Hansteen Cranner, B.: Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Zellen. Meldinger f. Norges Landbrukshoiskole, Bd. **2**, H. 1 und 2, 1922.
— Weitere Beiträge zur Biochemie und Physiologie der pflanzlichen Zellphosphatide. Meldinger f. Norges Landbrukshoiskole 1925.
Hills, G. M.: Aneurin (Vitamin B_1) and pyruvat metabolism by Staphylococcus aureus. Biochem. J. **32**, 383 (1938).
Jansen, P. C. P. and W. F. Donath: A chemical determination of aneurin (= vitamin B_1) by the thiochrome reaction. Rec. Trav. chim. Pays-Bas (Amsterdam) **55**, 1046 (1936).
Johann, F.: Untersuchungen über Mucorineen des Waldbodens. Centralbl. Bakteriol. 2. Abt. **85** (1932).
Isakova, A. A.: On the problem of the nature of the action of bacteriorhizae microorganismus on plants. C. r. Acad. Sci. V. R. S. S. **4**, 429 (1936). Ref. in Bull. Soc. bot. France **75**, 242 (1938).
Karrer, P., M. Staub und J. Staub: Vorkommen von Lichenin. Helv. Chim. Acta **7**, 159 (1924).
Knight, B. C. J. G.: The nutrition of Staphylococcus aureus: Nicotinic acid and vitamin B_1. Biochem. J. **31**, 731 (1937).
— The nutrition of Staphylococcus aureus. The activities of nicotin-amid, aneurin (vitamin B_1) and related compounds. Biochemic. J. **31**, 966 (1937).
Kögl, F. und A. J. Hagen-Smit: Biotin und Aneurin als Phytohormone. Hoppe Seylers Z. **243**, 209 (1936).
— und D. G. F. R. Kostermanns: Heterauxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. Hoppe Seylers Z. **228**, 113 (1934).
— und D. G. F. R. Kostermanns: Ueber die Konstitutionsspezifität des Heterauxins. Hoppe Seylers Z. **235**, 201 (1935).
— und B. Tönnis: Ueber das Biosproblem. Darstellung von kristallisiertem Biotin aus Eigelb. Hoppe Seylers Z. **242**, 43 (1936).
— und N. Fries: Ueber den Einfluss von Biotin, Aneurin und Mesoinosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. Hoppe Seylers Z. **249**, 93 (1937).
Krebs, H. A.: Dismutation of pyruvic acid in Gonococcus and Staphylococcus. Biochem. J. **31**, 661 (1937).
Kürbis, P.: Mykologische Untersuchungen über den Wurzelbereich der Esche. Flora neue Folge **31**, 129 (1937).
Lendner, A.: Les Mucorinées de la Suisse. Matér. Flore Crypt. suisse III (1908).
Linnemann, G.: Beitrag zu einer Flora der Mucorineae Marburgs. Flora **130** (1935/1936).
Lipmann, F.: Hydrogenation of vitamin B_1. Nature (Lond.) **138**, 1097 (1936).
— Die Dehydrierung der Brenztraubensäure. Enzymologia **4**, 65 (1937 a).
— Ueber den Umsatz der Brenztraubensäure und den Mechanismus der Vitamin B_1-Wirkung. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **76**, 255 (1937 b).
Lohmann, K. und Ph. Schuster: Ueber die Carboxylase. Naturwiss. **25**, 26 (1937 a).
— und Ph. Schuster: Untersuchungen über die Cocarboxylase. Biochem. Z. **294**, 188 (1937 b).

Lwoff, A. et H. Dusi: Le thiazol, facteur de croissance pour Polytoma ocellatum (Chlamydomonadiné). Importance des constituants de l'aneurine pour les Flagellés leucophytes. C. r. Acad. Sci. Paris **205,** 882 (1937 a).
— et H. Dusi: La pyrimidine et le thiazol, facteurs de croissance pour le Flagellé Polytoma caeca. C. r. Acad. Sci. Paris **205,** 630 (1937 b).
et H. Dusi: Le thiazol, facteur de croissance pour les Flagellés Polytoma caudatum et Chilomonas paramaecium. C. r. Acad. Sci. Paris **205,** 756 (1937 c).
— et H. Dusi: L'activité de diverses pyrimidines, considérées comme facteurs de croissance pour les Flagellés Polytomella caeca et Chilomonas paramaecium. C. r. Soc. Biol. Paris **127,** 1409 (1939).
— et E. Lederer: Remarque sur «l'extrait de terre» envisagé comme facteur de croissance pour les Flagellés. C. r. Soc. Biol. Paris **119,** 971 (1935).
— et M. Lwoff: L'aneurine, facteur de croissance pour le Cilié Glaucoma piriformis. C. r. Soc. Biol. Paris **126,** 664 (1937).
— et M. Lwoff: La spécificité de l'aneurine, facteur de croissance pour le Cilié Glaucoma piriformis. C. r. Soc. Biol. Paris **127,** 1170 (1938).
— M.: L'aneurine, facteur de croissance pour le Flagellé Trypanosomide Strigomonas oncopelti (Noguchi et Tilden). C. r. Soc. Biol. Paris **126,** 771 (1937).
— L'aneurine, facteur de croissance pour les Strigomonas (Flagellés Trypanosomides). C. r. Soc. Biol. Paris **128,** 241 (1938).
Melin, E.: Untersuchungen über die Bedeutung der Baummycorrhiza. Eine ökologisch-physiologische Studie. Jena, Gustav Fischer, 1925.
— und G. Lindenberg: Ueber den Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Mycorrhizenpilze. Botaniska Notiser **1939,** 241.
Molisch: Mikrochemie der Pflanzen III. Jena: Fischer, 1923.
Möller, F.: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märkischen Sandboden. Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen **35** (1903).
Moser, W.: Untersuchungen über Wachstumsfaktoren bei Mikroorganismen. Die Trennung der Wirkstoffe vitaminischer Natur des Weizenkeimes. Diss. 1940, Paul Haupt, Bern.
Müller, W. F.: Zur Physiologie von Mucor Ramannianus. Ber. schweiz. bot. Ges. **47,** 277 (1937).
— et W.-H. Schopfer: L'action de l'aneurine et de ses constituants sur Mucor Ramannianus Möll. C. r. Acad. Sci. Paris **205,** 687 (1937).
Peters, R. A., H. W. Kinnersley, J. Orr-Ewing and V. Reader: The relation of vitamin B_1 to the growth-promoting factor for a Streptothrix. Biochem. J. **22,** 445 (1928).
Pistor: Beiträge zur Kenntnis der biologischen Tätigkeit von Pilzen in Waldböden. Centralblatt f. Bakterienkunde **80** (1929).
Pringsheim, E. G.: Wuchsstoffe im Erdboden? Naturwiss. **23,** 197 (1935).
Robbins, W. J.: Thiamin and the growth of spezies of Phytophthora. Bull. Thorrey bot. Club **65,** 267 (1938).
— and M. A. Bartley: Thiazole and the growth of excised tomato roots. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **23,** 385 (1937).
— M. A. Bartley, A. G. Hogan and L. R. Richardson: Pyrimidine and thiazole intermediates as substitutes for vitamin B_1. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **23,** 388 (1937).
— and F. Kavanagh: Intermediates of vitamin B_1 and growth of Phycomyces. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **23,** 499 (1937).
— and F. Kavanagh: Intermediates of vitamin B_1 and the growth of Torula. Plant Physiol. **13,** 611 (1938 a).
— and F. Kavanagh: The specifity of thiazole for Phycomyces blakesleeanus. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **24,** 141 (1938 b).

Robbins, W. J. and F. Kavanagh: The specifity of thiazole for Phycomyces blakesleeanus. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **24,** 145 (1938 c).
— and F. Kavanagh: Vitamin B_1 or its intermediates and growth of certain fungi. Amer. J. Bot. **25,** 229 (1938 d).
— and F. Kavanagh: Evidence for a second thiamin. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **24,** 229 (1938 e).
Schaffstein, G.: Untersuchungen über die Avitaminose der Orchideenkeimlinge. J. Bot. **86,** 720 (1938).
Schellenberg, H. C.: Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulosen. Flora **98,** 257 (1908).
Scheunert, A. und M. Schieblich: Ueber Vitaminbildung durch Aspergillus oryzae. Biochem. Z. **286,** 66 (1936).
Schopfer, W.-H.: Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces blakesleeanus. Influence des substances vitaminiques. Bull. Soc. bot. suisse **40,** 87 (1931), **41,** 73 (1932).
— Certains phosphatides peuvent-ils se substituer au facteur de croissance de Mucorinées ? C. r. Soc. phys. hist. nat. Genève **49,** 155 (1932).
— Versuche über die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf einige Mucorineen. Ber. dtsch. Bot. Ges. **52,** 560 (1934 a).
— Versuche über die Wirkung von reinem kristallisierten Vitamin B_1 auf Phycomyces. Ber. dtsch. bot. Ges. **52,** 308 (1934 b).
— Sur le facteur de croissance du germe de blé, son extraction par l'acétate de plomb. Arch. Mikrobiol. **5,** 502 (1934 c).
— Etude sur les facteurs de croissance. Action de la vitamine cristallisée B_1 et de l'extrait de germe de blé sur Rhizopus et d'autres Mucorinées. Z. Vitaminforsch. **4,** 187 (1935 a).
— Vitamine et facteurs de croissance chez les plantes. Recherches sur la solubilité des facteurs de croissance. Le facteur de l'urine. Archiv f. Mikrobiol. **6,** 290 (1935 b).
— Recherches sur l'action de divers extraits végétaux sur le développement de Phycomyces. Arch. Mikrobiol. **7,** 156 (1936).
— Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire (Phycomyces blakesleeanus). Le rôle des facteurs de croissance. Protoplasma (Berlin) **28,** 381 (1937 a).
— L'action des constituants de l'aneurine sur les levures (Rhodotorula rubra et flava). C. r. Acad. Sci. Paris **205,** 445 (1937 b).
— L'aneurine et ses constituants, facteurs de croissance de Mucorinée. C. r. Soc. Biol. Paris **32,** 824 (1937 c).
— La spécificité d'action de l'aneurine sur Phycomyces. Le rôle des constituants de l'aneurine et de leurs produits de substitution. Bull. Soc. bot. suisse **47,** 460 (1937 d).
— La pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine) facteur de croissance de microorganismes (Rhodotorula, Mucorinées, Dematium). Protoplasma (Berl.) **31,** 105 (1938 a).
— Aneurine et hétérotropie chez les microorganismes. Arch. Mikrobiol. **9,** 116 (1938 b).
— Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. Erg. Physiol. **16,** 1 (1939).
— et S. Blumer: Les facteurs de croissance du genre Ustilago. C. r. Acad. Sci. Paris **206,** 1141 (1938).
— und S. Blumer, unter Mitwirkung von V. Kocher: Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea. II. Wirkung des Aneurins und anderer Wuchsstoffe vitaminischer Natur. Arch. Mikrobiol. **9,** 305 (1938).

Schopfer, W.-H. et A. Jung: L'action des produits de désintégration de l'aneurine sur Phycomyces. Le second facteur de croissance de Mucorinées. C. r. Acad. Sci. Paris **204,** 1500 (1937).

— et W. Moser: Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance de microorganismes contenus dans le germe de blé. Protoplasma (Berl.) **26,** 538 (1936).

— et W.-F. Müller: Recherches sur la décomposition thermique de l'aneurine. C. r. Soc. Biol. Paris **128,** 372 (1938).

Sinclair, H. M.: Growth Factors for Phycomyces. Nature Lond. **140,** 360 (1937).

Sivadjian, J.-M.: La chimie des vitamines et des hormones. Gauthier-Villars 1938.

Zycha, H.: Kryptogamenflora der Mark Brandenburg und angrenzender Gebiete. Bd. VI a, Leipzig: Borntraeger, 1935.

Lebenslauf.

Ich wurde am 15. Oktober 1909 in Reichenbach bei Frutigen geboren. Nach dem Besuch der dortigen Primarschule und der Sekundarschule in Spiez trat ich 1925 ins Lehrerseminar Bern-Hofwil ein. 1929 wurde ich zum Primarlehrer patentiert. Als solcher amtete ich vier Jahre in der Gemeinde Reichenbach. Im Frühling 1933 liess ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Bern immatrikulieren und erwarb 1935 das Sekundarlehrerpatent mathematisch-naturwissenschaftlicher Richtung. Nach einer Stellvertretung am Lehrerinnenseminar in Thun setzte ich meine Studien an der Universität Bern bis zum Sommer 1939 fort. Hierauf arbeitete ich drei Monate im Laboratoire de Biologie Végétale in Fontainebleau (Sorbonne, Paris). Im Herbst 1939 erwarb ich dann das bernische Gymnasiallehrerpatent und bestand am 21. Dezember des gleichen Jahres die Doktorprüfung in den Fächern Botanik, Zoologie und Chemie.

Seit dem Sommersemester 1936 bin ich Assistent im botanischen Institut der Universität Bern.